



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

MACIEJ CIEŚLAK

*Synteza i właściwości peptydowych dendronów
i ich dimerów o strukturze „bola”*

Praca doktorska przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Chemii
Organicznej Polskiej Akademii Nauk w celu uzyskania stopnia doktora
nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Zofia Lipkowska

Warszawa 2022

*Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, które
przyczyniły się do powstania tej pracy:*

Szczególne podziękowania pragnę złożyć mojej promotor

Pani prof. dr. hab. Zofii Lipkowskiej

*za opiekę merytoryczną, cierpliwość, życzliwość, poświęcony mi czas oraz wprowadzenie w
świat dendrymerów i badań naukowych*

dr inż. Mai Morawiak, dr inż. Magdalenie Urbanowicz, dr Oldze Staszewskiej - Krajewskiej

*za niesamowitą atmosferę współpracy, wsparcie w trakcie prowadzonych badań, wspólną
realizację zadań badawczych oraz rady.*

Wiktorowi Ignacakowi

za serdeczną współpracę i ogromną wiedzę z zakresu technik oczyszczania.

dr Filipowi Stankowi i mgr inż. Arlecie Madej

za wspólne rozmowy, życzliwość i wsparcie w kryzysowych chwilach.

*Narzeczonej za to, że zawsze była przy mnie w najtrudniejszych chwilach, nigdy we mnie
nie zwątpiła i wierzyła, że dam radę.*

Rodzicom i Przyjaciółom *za wsparcie, motywację do pracy oraz dobre słowo.*

Zarządowi Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego *za kilka lat współpracy,
wspaniałe projekty oraz możliwość zdobywania cennych umiejętności i doświadczeń.*

Praca doktorska wykonana w ramach projektu:



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

„Projektowanie i synteza pH- lub redox-czułych dimerycznych dendronów jako nanonarzędzia do transportu siRNA lub leków do komórek glejaka”

realizowanego w ramach grantu OPUS 10

Narodowego Centrum Nauki

Numer grantu: UMO-2015/19/B/ST5/03547

Suplement

Wyniki badań zebranych w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w formie następujących artykułów:

1. Maciej Cieślak, Damian Ryszawy, Maciej Pudełek, Magdalena Urbanowicz, Maja Morawiak, Olga Staszewska-Krajewska, Jarosław Czyż, Zofia Urbańczyk-Lipkowska, Bioinspired Bola-Type Peptide Dendrimers Inhibit Proliferation and Invasiveness of Glioblastoma Cells in a Manner Dependent on Their Structure and Amphipathic Properties, *Pharmaceutics* 2020, 12, 1106; doi:10.3390/pharmaceutics12111106
2. Morawiak M, Stolarska M, Cieślak M, Urbanczyk-Lipkowska Z. Interactions of rationally designed acid with α -helix and β -sheet structures of poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid. *Pept Sci.* 2020;e24155. <https://doi.org/10.1002/pep2.24155>

Inne publikacje:

3. Artykuł naukowy w Gazecie Farmaceutycznej p.t. „Terapia genowa w leczeniu nowotworów układu nerwowego – nowe nośniki siRNA” Vol XXVII, Nr 4 (310), 2018 ISSN 1230-9923.
4. Monografia pokonferencyjna „Kwadrans dla chemii”, artykuł p.t. „Dendrymery - związki o potencjale aplikacyjnym w nanomedycynie”, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 25-29.04.2018 r., Skorzęcin , ISBN 978-83-7594-170-8.

Zgłoszenie patentowe:

P.435269 pt. „Nanocząsteczkowe, peptydowe dendrymery, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowania” (data zgłoszenia: 12.09.2020).

Niektóre z zaprezentowanych zagadnień zostały zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach w formie komunikatów ustnych i posterów:

1. Komunikat ustny, “Synthesis of bioinspired peptide dendrimers with the bola-structure”, M. Cieślak, Z. Urbańczyk-Lipkowska, Current challenges in glioblastoma therapy, IChO PAN, Warszawa, 16.12.2020 r.
2. Poster, 15th EYCN Delegate Assembly, “Synthesis of „bola”-type peptide dendrimers as nanocarriers for drugs”, M. Cieślak, M. Stolarska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Sitges, 26-30.01.2020r.
3. Komunikat ustny, First CA17140 COST Conference, „Synthesis of Peptidic Bola-Dendrimers”, M. Cieślak, M. Stolarska, O. Staszewska-Krajewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Ryga, 15.10-17.10.2019r.

4. Komunikat ustny, 71. Zjazd Chemikow, „Synthesis of novel bola-type amphiphilic peptide dendrimers as nanocarriers for delivery of siRNA or drugs”, Maciej Cieślak, Magdalena Stolarska, Zofia Urbanczyk-Lipkowska, Wysokie Tatry, 9.09-13.09.2019r.
5. Komunikat ustny, 62. Zjazd Naukowy PTChem, „Synthesis of novel bola-type amphiphilic peptide dendrimers and their complexes with anticancer drugs”, M. Cieślak, M. Stolarska, O. Staszewska-Krajewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Warszawa, 2.09-6.09.2019r.
6. Poster, COST ACTION WG1 Meeting, „Synthesis of novel bola-type amphiphilic peptide dendrimers and their complexes with anticancer drugs”, M. Cieślak, M. Stolarska, O. Staszewska-Krajewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Madera 13.07-14.07.2019r.
7. Komunikat ustny – invited oral speaker, 11th International Dendrimers Symposium, „Molecular characteristics, membrane affinity, transport properties and in vitro cytotoxicity of bola-type peptide dendrimers” Maciej Cieślak, Magdalena Stolarska, Katarzyna Trzeciak, Zofia Urbanczyk-Lipkowska, Madera, 14.07-18.07.2019r.
8. Komunikat ustny, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej PTChem, „Synteza amfifiliowych dendrymerów typu „bola” jako potencjalnych nośników siRNA i/lub leków”, Maciej Cieślak, Magdalena Stolarska, Zofia Lipkowska, Ustroń, 10.04.14.04.2019r.
9. Poster, 21st JCF Frühjahrs-symposium and 2nd European Young Chemists' Meeting, „Synthesis of novel bola-type amphiphilic peptide dendrimers as nanocarriers for delivery of siRNA or drugs”, Maciej Cieślak, Magdalena Stolarska, Zofia Lipkowska, Bremen, 20.03-23.03.2019r.
10. Poster, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem, „Synteza nowych amfifiliowych dendrymerów typu „bola” jako potencjalnych nanonośników”, Maciej Cieślak, Magdalena Stolarska, Zofia Lipkowska, Warszawa, 8.12.2018r.
11. Poster, Biodendrimer 2018: 6th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers, „Design of novel bola amphiphilic dendrimers as efficient cellular carrier system”, Maciej Cieślak, Zofia Lipkowska, Jolanta Janiszewska, Urbino, 4.06-7.06.2018r.
12. Poster, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej PTChem, „Peptydowe dendrony jako nośniki siRNA w terapii genowej nowotworów układu nerwowego”, Maciej Cieślak, Zofia Urbańczyk-Lipkowska, Skorzęcin, 24-29.04.2018r.
13. Poster, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem, „Projektowanie, optymalizacja syntezy i charakterystyka amififilowych peptydowych dendronów”, Maciej Cieślak, Zofia Urbańczyk Lipkowska, Bydgoszcz, 8-9.12.2017r.
14. Wykład „Amphiphilic Peptide Dendrimers That Address Pathology of the Nervous System” Z. Urbańczyk-Lipkowska, M.Morawiak, M.Cieślak, V.Cena, Modern trends in dendrimer

chemistry and applications, 1-4.10.2017, Moskwa.

15. Poster, „Projektowanie i synteza koniugatów naturalnych polifenoli i peptydowych dendronów” Maciej Cieślak, Zofia Urbańczyk-Lipkowska, Maja Morawiak, Chemsession'17, 9.06.2017r., Warszawa.

16. Komunikat ustny, „Peptide dendrimers as novel systems for siRNA delivery to cancer cells” Maciej Cieślak, Zofia Urbańczyk-Lipkowska, Zjazd Zimowy SSPTChem 2016, Lublin, 17.12.2016.

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

Arg	<i>L</i> -Arginina
AMP	peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP, ang. antimicrobial peptides)
BBB	bariera krew-mózg (ang. blood-brain barrier)
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
CD	dichroizm kołowy
2-Cl-Z	grupa 2-chlorobenzylksykarbonylowa
2CL	żywica 2-chlorotrylowa
DCC	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DCM	dichlorometan
DIC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropyletyloamina
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMF	<i>N,N'</i> -dimetyloformamid
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DOX	doksorubicyna
EDC	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
Et ₃ N	trietyloamina
EtOAc	octan etylu
ESI	technika jonizacji poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (elektrosprej)
Fmoc	grupa 9-fluorenylometyloksycarbonylowa
HATU	heksafluorofosforan O-(7-azabenzotriazolo-1-ylo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy
His	<i>L</i> -Histydyna
HOBt	1-hydroksybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -hydroksysukcynimid
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
Lys	<i>L</i> -Lizyna
Lys-OMe	ester metylowy <i>L</i> -lizyny
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
Orn	<i>L</i> -ornityna
Orn-OMe	ester metylowy <i>L</i> -ornityny

Oxyima pure	octan 2-cyano-2-(hydroksyimino)etylu, (nr CAS : 3849-21-6)
OUN	Ośrodkowy układ nerwowy
PAMAM	dendrymer poli(amidoaminowy)
PEG	poli(glikol etylenowy)
Phe	<i>L</i> -fenyloalanina
Phe-OMe	ester metylowy <i>L</i> -fenyloalaniny
PLGA (CD)	kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (Masa molekularna > 50 000, MP Biomedicals)
PLL (CD)	polilizyna (Masa molekularna 4000-20 000, MP Biomedicals)
PLL	dendrymer polilizynowy
PPI	dendrymer polipropylenoiminowy
Pro	<i>L</i> -Prolina
PyBOP	heksafluorofosfonian (benzotriazol-1-iloksy) tripirolidynofosfoniowy
SEC	chromatografii sączenia molekularnego
siRNA	mały interferujący RNA
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
SPPS	synteza peptydów na nośniku stałym (ang. Solid phase peptide synthesis)
TEA	trietyloamina
TFA	kwas trifluorooctowy
THF	tetrahydrofuran
TIS	triizopropylosilanu
TMZ	Temozolomid
Trp	<i>L</i> -Tryptofan

Abstract

Diseases of the nervous system (cancer, neurodegenerative diseases) are currently the second cause of death in developing countries. Modern medicine is expanding the range of possible therapies by increasing the use of nanoparticles such as polymers and dendrimers. The latter are of great interest due to their high monodispersity, well-defined synthesis methods and practically unlimited possibilities of building complex multifunctional structures.

Research on peptide dendrimers has been carried out for years at the Institute of Organic Chemistry of the Polish Academy of Sciences under the leadership of Prof. Z. Lipkowska. These branched macromolecules both in terms of structure and biological properties mimic natural peptides present in plant and animal organisms, and thus are potential antimicrobial, anticancer compounds and can be carriers of, for example, drugs or nucleic acids. Such constructs combining multiple beneficial properties allow the final structure to be biocompatible and biodegradable.

The aim of my research was to design and develop a strategy for the synthesis of nanoparticle peptide dendrons and their dimers with a "bola" structure using a classical method in solution or on a solid support, and studying the structure and properties of the obtained compounds. The biological target set for the obtained nanocompounds were diseases of the nervous system, in particular glioma cell lines.

In the first part of my research, I developed optimal synthesis conditions for peptide dendrons functionalized with cinnamic acid derivatives or imidazole derivatives. The second part of my research concerned the development of a proper methodology for the synthesis of peptide dendrimers of the "bola" type having stable and degradable organic linkers in their structure.

For selected compounds, studies and analyses of the relationship between structure and biological activity of dendrimers have been carried out, including studies of molecular conformation by circular dichroism, studies of antioxidant properties, studies of complexing properties, interactions of dendrons with secondary structures (PLGA and PLL), and cytotoxicity studies against several glioma lines.

Streszczenie

Choroby układu nerwowego (nowotwory, choroby neurodegeneracyjne) są obecnie drugą przyczyną zgonów w krajach rozwijających się. Współczesna medycyna poszerza zakres możliwych terapii coraz częściej wykorzystując nanocząsteczki, takie jak polimery czy dendrymery. Te ostatnie cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na wysoką monodispersyjność, dobrze zdefiniowane metody syntezy i praktycznie nieograniczone możliwości budowania skomplikowanych wielofunkcyjnych struktur.

Badania nad peptydowymi dendrymerami prowadzone są od lat w Instytucie Chemii Organicznej PAN pod kierownictwem prof. Z. Lipkowskiej. Te rozgałęzione makrocząsteczki zarówno pod kątem strukturalnym jak i właściwości biologicznych naśladują naturalne peptydy obecne w organizmach roślin i zwierząt, a tym samym stanowią potencjalne związki przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe oraz mogą być nośnikami np. leków lub kwasów nukleinowych. Takie konstrukty łączące w sobie wiele korzystnych właściwości pozwalają na nadanie ostatecznej strukturze biokompatybilności i biodegradowalności.

Prowadzone przeze mnie badania miały na celu zaprojektowanie i opracowanie strategii syntezy nanocząsteczkowych peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola” klasyczną metodą w roztworze bądź na nośniku stałym oraz zbadanie struktury i właściwości uzyskanych związków. Celem biologicznym wyznaczonym dla uzyskanych nanozwiązków były choroby układu nerwowego, w szczególności linie komórkowe glejaka.

W pierwszej części badań opracowałem optymalne warunki syntezy dla peptydowych dendronów sfunkcjonalizowanych pochodnymi kwasu cynamonowego lub pochodnymi imidazolu. Druga część moich badań dotyczyła opracowania właściwej metodologii syntezy peptydowych dendrymerów typu „bola” posiadających w swojej strukturze trwałe i degradowalne łączniki organiczne.

Dla wybranych związków przeprowadzone zostały badania oraz analizy zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną dendrymerów, w tym badania konformacji molekularnej metodą dichroizmu kołowego, badania właściwości antyoksydacyjnych, badania własności kompleksujących, oddziaływania dendronów z drugorzędowymi strukturami (PLGA i PLL) a także badania cytotoksyczności wobec kilku linii glejaka.

Spis treści

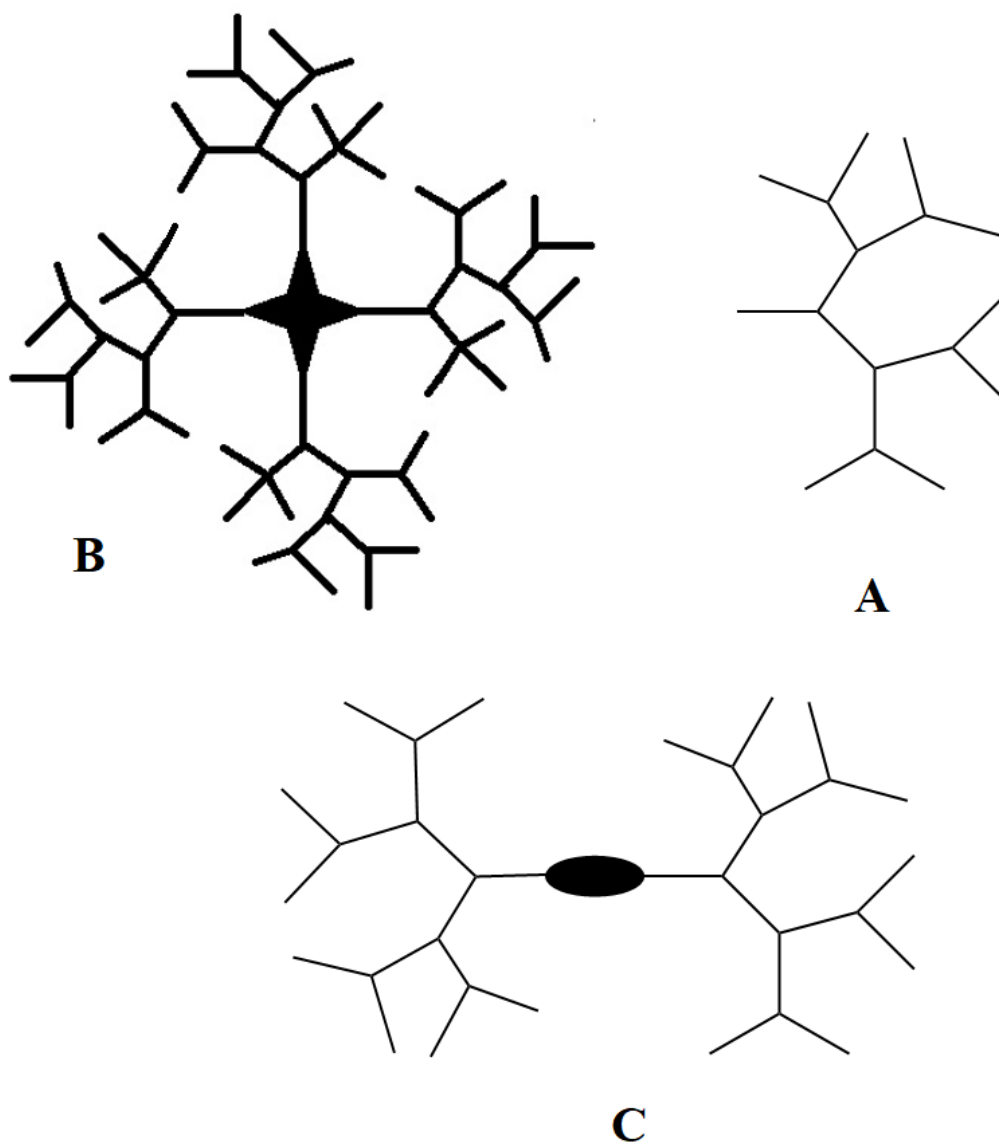
Suplement	4
Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń	7
Abstract	9
Streszczenie	10
I. WSTĘP LITERATUROWY	12
1. Dendrymery – rozgałęzione polimery	12
1.1. Metody syntezy dendrymerów	13
1.2 Dendrymery peptydowe	16
1.3 Sposoby syntezy dendrymerów peptydowych	19
1.4 Koncepcja nieciągłego farmakoforu w zastosowaniu do projektowania biologicznie aktywnych dendrymerów peptydowych	25
2. Dendrymery typu „bola”	28
3. Dendrymery jako nanonośniki	35
4. Dendrymery i choroby układu nerwowego	41
5. Związki o właściwościach antyoksydacyjnych, w tym koniugaty dendrymer – antyoksydant oraz ich rola w procesie nowotworzenia i leczenia nowotworów.....	44
II. HIPOTEZA NAUKOWA, CEL I ZAKRES PRACY	49
III. BADANIA WŁASNE	51
1. Strategia syntezy zasadowych dendrymerów peptydowych	51
1.1 Synteza małych dimerów zawierających pochodne kwasu cyjankowego	52
1.2 Synteza dendronów lizynowych na nośniku stałym	55
1.3 Synteza dendronów lizynowych w roztworze	60
1.4 Synteza dendronów ornitynowych w roztworze	61
2. Synteza dendrymerów typu „bola” w roztworze	65
2.1 Synteza według strategii 1	66
2.2 Synteza według strategii 2	66
2.2.1 Synteza rdzeni dendrymerów typu „bola”	67
2.2.2 Funkcjonalizacja wybranych rdzeni dendrymerów „bola”	69
3. BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE	73
IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	93
V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	97
LITERATURA	137

I. WSTĘP LITERATUROWY

1 Dendrymery – rozgałęzione polimery

Pierwsza publikacja dotycząca związków organicznych o rozgałęzionej budowie pochodzi z roku 1978, kiedy to zespół F. Voegtle przedstawił cykl następujących po sobie reakcji prowadzący do otrzymania cząsteczki kaskadowo-rozgałęzionej.[1] W roku 1985 Donald Tomalia, opisał metodę syntezy dendrymeru poliamidoaminowego (tzw. PAMAM), nazwanej później „syntezą rozbieżną”. [2] W tym czasie także zespół George’a F. Newkome’a opublikował pracę przedstawiającą syntezę związków o rozgałęzionej strukturze nazwanych arborolami.[3] Od tego momentu chemia dendrymerów stała się nową, intensywnie rozwijaną dziedziną. Autorem nazwy „dendrymer” jest uważany za twórcę nowej grupy związków prof. D. Tomalia, – i pochodzi ona z połączenia greckiego słowa „dendron” oznaczającego drzewo ze słowem „meros” oznaczającego część. W początkach rozwoju tej klasy związków powstało kilka innych typów dendrymerów, różniących się strukturą i sposobem otrzymywania, np. dendrymery karbosilanowe [4], fosforowe [5], polipropylenoiminowe (PPI) [6], polisacharydowe [7], itp. Poza globalnie badanymi dendrymerami prof. Tomalii PAMAM i dendrymerami PPI otrzymanymi przez Frechet'a, chemia i zastosowania każdej z pozostałych grup dendrymerów są na ogół rozwijane w wielu ośrodkach.

Pod względem chemicznym dendrymery są trójwymiarowymi polimerami rozgałęzionymi, o dobrze zdefiniowanej masie molowej i chemicznej strukturze. W budowie dendrymeru wyróżnia się trzy charakterystyczne elementy: rdzeń definiujący ilość ramion, odchodzące od niego rozgałęzione warstwy zwane generacjami, oraz powierzchnię zakończoną wieloma takimi samymi lub różnymi grupami funkcyjnymi. Do tej klasy związków należą też „dendrony” o prostszej strukturze, która podczas syntezy rozwijana jest tylko w jednym kierunku. Jak widać na Rys. 1, cechą charakterystyczną takich cząsteczek jest poliwalentność, czyli możliwość umieszczenia na powierzchni cząsteczek wielu grup funkcyjnych o dowolnej aktywności a także występowanie wewnątrz cząsteczki wolnych przestrzeni. Dlatego związki takie są najczęściej badane pod kątem własności nośnikowych dla kowalencyjnie lub niekowalencyjnie związanych cząsteczek. Inną zaletą tych związków jest praktycznie nieograniczona liczba permutacji strukturalnych dająca możliwość projektowania cząsteczek pod konkretne zastosowania.



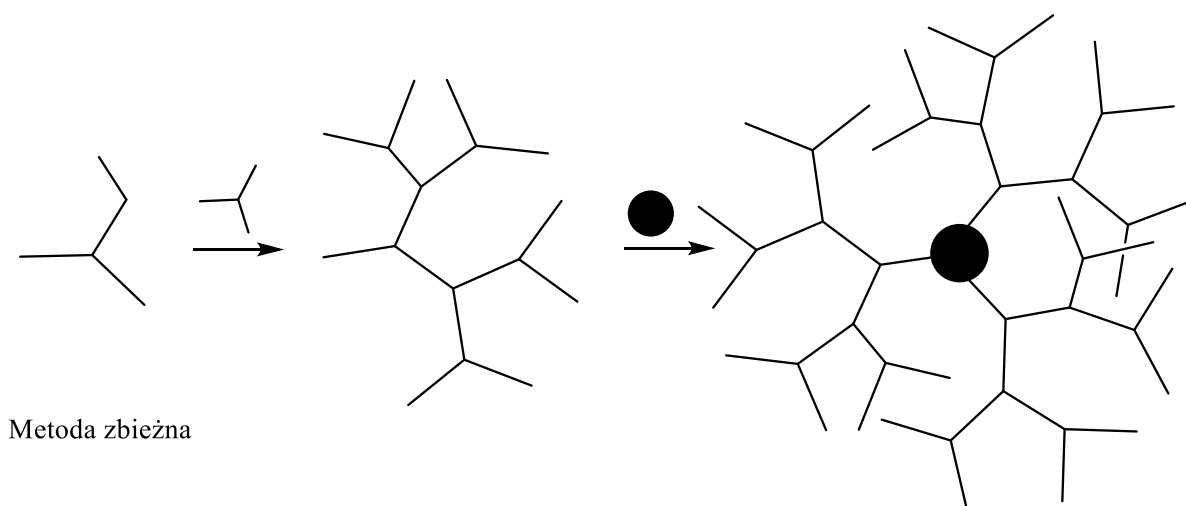
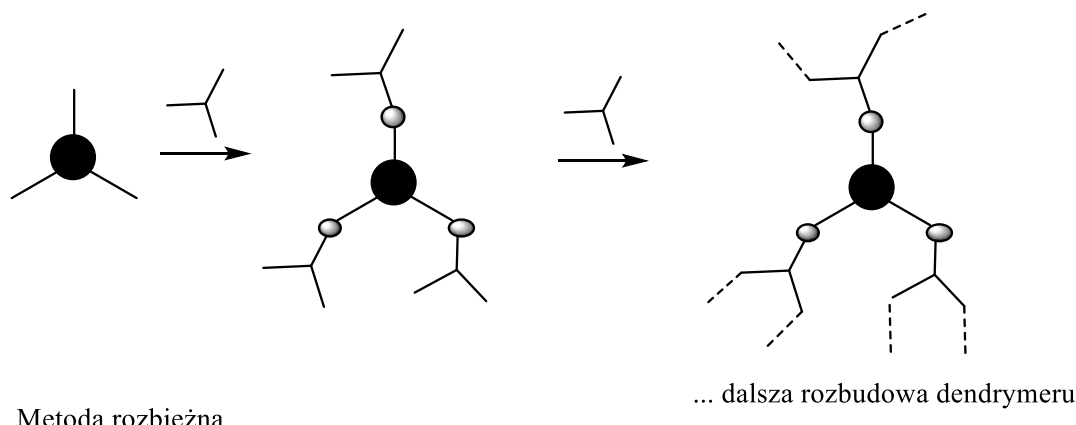
Rys. 1. Charakterystyczna budowa dendronu: A, dendrymeru: B dendrymeru typu „bola”: C.

1.1. Metody syntezy dendrymerów

W przeciwieństwie do polimerów, dendrymery syntetyzuje się wieloetapowo w sposób kontrolowany (ang. step-by-step synthesis), co zwykle skutkuje dłuższym czasem reakcji oraz mniejszą wydajnością. Z tego powodu komercyjna dostępność dendrymerów jest ograniczona, a koszt wytwarzania dendrymerów w porównaniu do polimerów jest stosunkowo wysoki.[8]

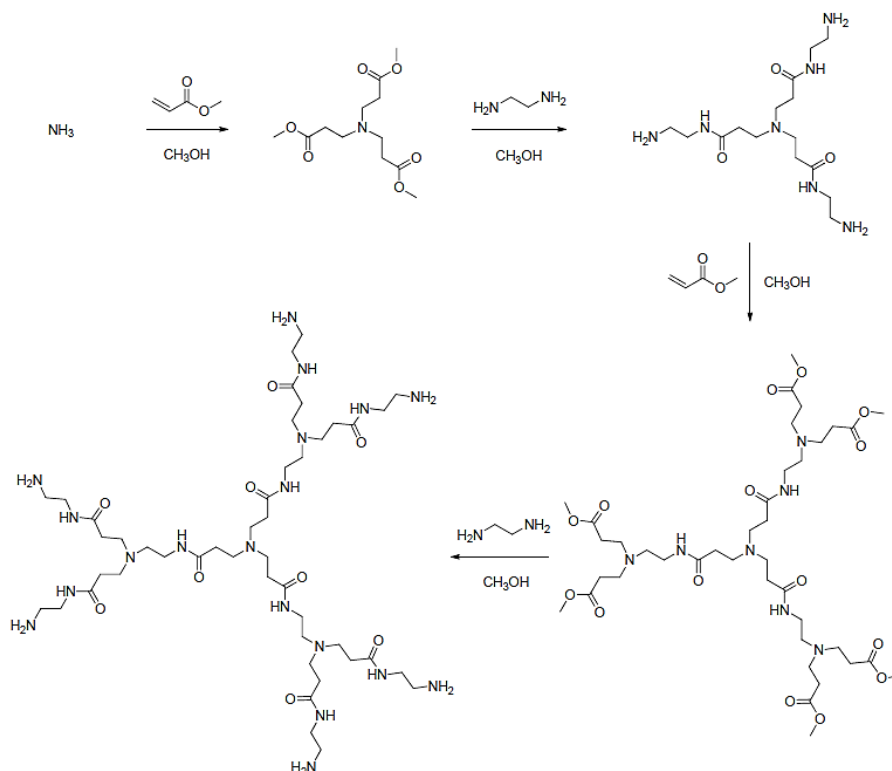
Dendrymery mogą być otrzymywane za pomocą dwóch różnych strategii syntetycznych metodą zbieżną lub rozbieżną (Rys. 2.). Synteza rozbieżna dendrymeru przebiega w sposób etapowy i zaczyna się od wielofunkcyjnego rdzenia, który jest rozbudowywany kolejnymi elementami rozgałęziającymi w kierunku peryferii. W metodzie rozbieżnej, liczba grup funkcyjnych gwałtownie wzrasta wraz z liczbą generacji. Natomiast metoda zbieżna,

w przeciwieństwie do wcześniejszej, rozpoczyna się od syntezy prostszych rozgałęzionych fragmentów, tzw. dendronów, które następnie przyłączane są do wielofunkcyjnego rdzenia. [9]

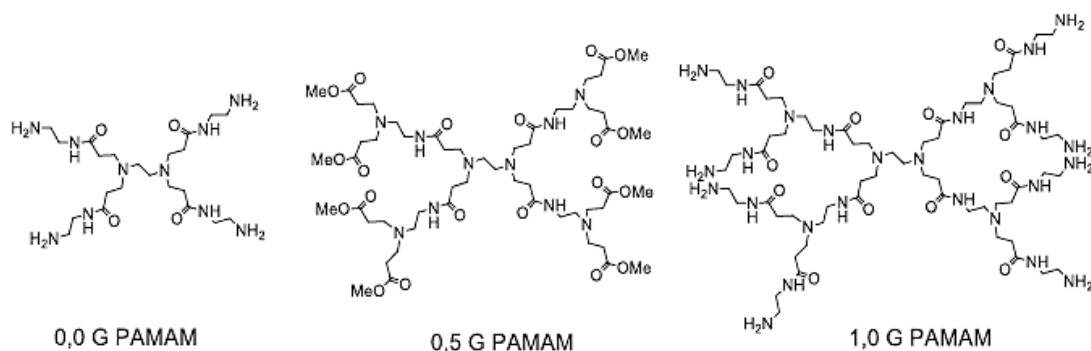


Rys. 2. Metoda rozbieżna i zbieżna syntezy dendrymerów.

Jak pokazano na Rys. 3, syntezę klasycznych dendrymerów PAMAM prowadzi się w dwóch powtarzających się etapach aż do uzyskania pożądanego dendrymeru. Pierwszy etap reakcji polega na alkilowaniu pierwszorzędowych grup aminowych za pomocą estru metylowego kwasu akrylowego (addycja Michaela). Natomiast w drugim etapie następuje reakcja amidowania grup estrowych w obecności nadmiaru etylenodiaminy, co prowadzi do wytworzenia związku z pierwszorzędowymi grupami aminowymi. W celu dalszego rozgałęzienia związku poddaje się go ponownie alkilowaniu (addycja Michaela), a następnie amidowaniu aż do otrzymania pożądanego wielkości (generacji) związku (Rys. 4). [10]



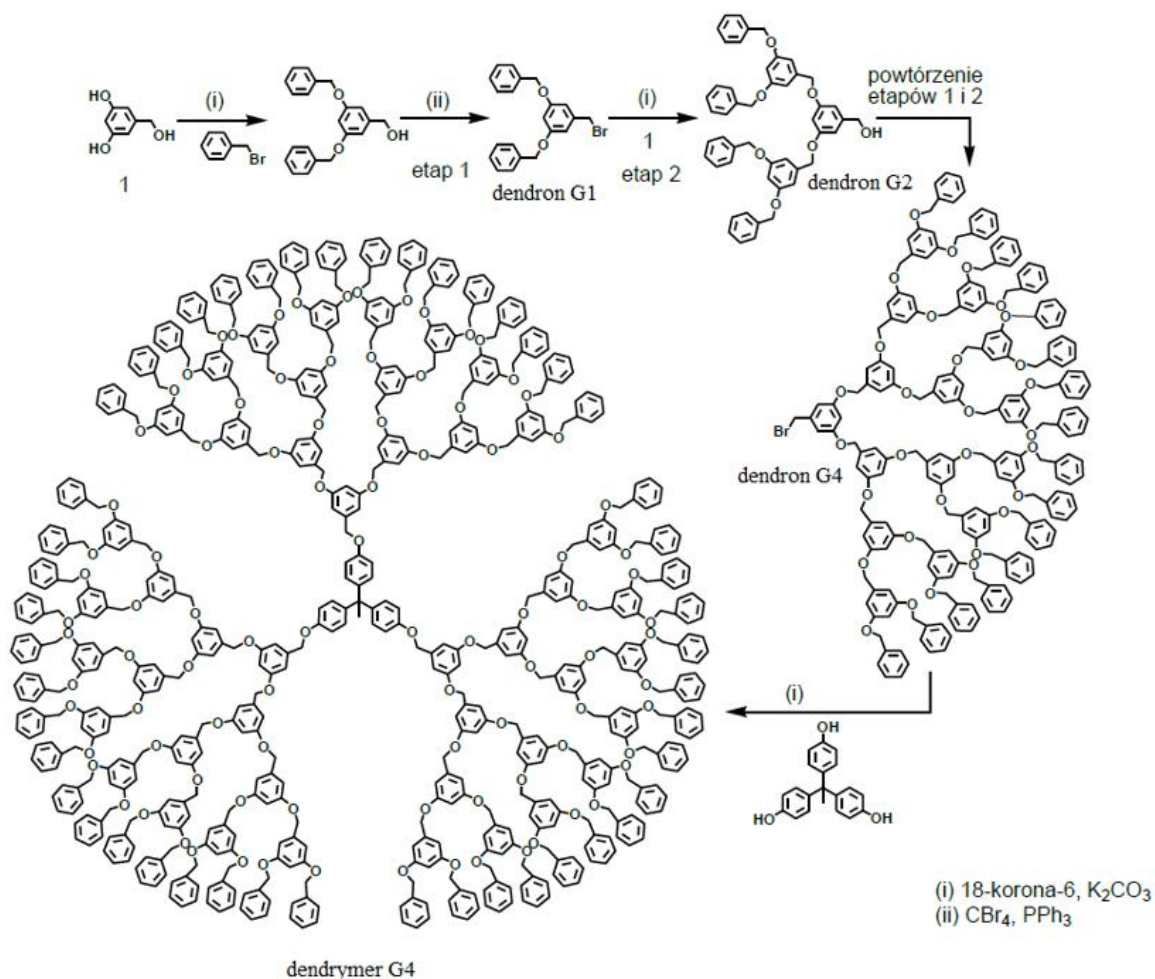
Rys. 3. Synteza rozbieżna dendrymerów PAMAM.



Rys.4. Dendrymery PAMAM: rdzeń (0,0 G), generacja połówkowa 0,5 G oraz pełna 1,0 G.

Przykładem dendrymeru, który został otrzymany według metody syntezy zbieżnej jest dendrymerpolibenzyloeterowy (Rys. 5) W przypadku tej reakcji monomer stanowi alkohol 3,5-dihydroksybenzylowy, który w pierwszym etapie podlega alkilowaniu z bromkiem benzylovym prowadząc do wytworzenia dendronu pierwszej generacji (pochodna benzylova G1). Pochodną przekształca się w bromek z zastosowaniem CBr₄ i PPh₃ i poddaje kolejnej reakcji z alkoholem 3,5-dihydroksybenzylowym, co prowadzi do wytworzenia dendronu drugiej generacji (pochodna benzylova G2). Powtarzając etap 1 i 2 reakcji otrzymuje się

dendron czwartej generacji, który po połączeniu z rdzeniem tworzy właściwy dendrymer czwartej generacji. [11]



Rys. 5. Synteza zbieżna dendrymeru polibenzyloeterowego. [11]

Pomimo ogromnego potencjału aplikacyjnego, zastosowanie dendrymerów w badaniach podstawowych, a tym bardziej w lecznictwie zależy od opracowania metodyki ich syntezy i oczyszczania na dużą skalę. Dlatego nadal najczęściej laboratoriów zajmuje się badaniem dostępnych komercyjnie dendrymerów PAMAM i PPI.

1.2 Dendrymery peptydowe

Liczne badania wskazują na rosnącą rolę dendrymerów peptydowych w kontekście zastosowań medycznych i diagnostycznych. Ponadto, uważa się, iż preparaty oparte na peptydach mogą stanowić skuteczne i selektywne leki, w szczególności do zastosowania w innowacyjnych terapiach nowotworowych, co związane jest z ich specyficznością, biodostępnością i niską toksycznością. [12]

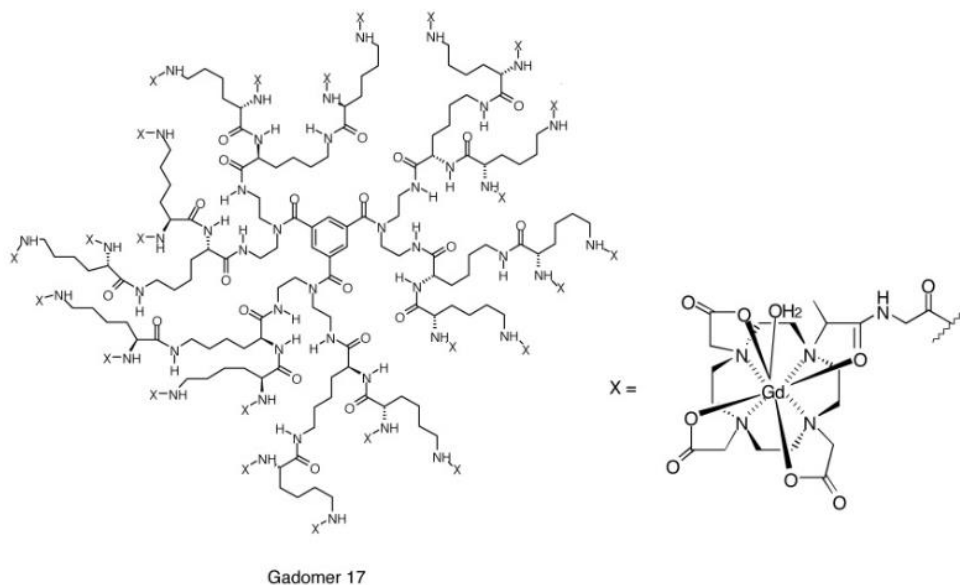
Dendrymery peptydowe tworzą odrębną grupę makrocząsteczek peptydowych o budowie rozgałęzionej, w których wiązania peptydowe tworzone są między naturalnymi lub strukturalnie modyfikowanymi aminokwasami. Obecnie wyróżnia się dwa rodzaje dendrymerów peptydowych: a) dendrymery złożone wyłącznie z aminokwasów oraz b) dendrymery mieszane, tj. aminokwasowo - organiczne. Możliwość tworzenia rozgałęzień stwarzają naturalne aminokwasy posiadające w łańcuchu bocznym grupę aminową (lizyna, arginina lub rzadziej wykorzystywana ornityna) lub karboksylową (np. kwas asparaginowy, glutaminowy, itp.). Natomiast ortogonalne podstawienia dwóch grup aminowych/karboksylowych pozwala na stereoselektywne wprowadzenie dwóch różnych podstawników co znacznie wzbogaca możliwości projektowania odpowiednich struktur. Jeżeli rdzeniem w takich strukturach jest któryś z powyższych aminokwasów to używając dobrze znane metody chemii peptydów można dodatkowo w dogodny sposób modyfikować także C-koniec otrzymując związki rozgałęzione o strukturze dendrymerów lub dendronów. Trzeba dodać, że otrzymywanie peptydowych dendrymerów o dobrze zdefiniowanej strukturze i małej ilości defektów strukturalnych jest możliwe dzięki dobrze poznanym, wysokowydajnym i stereoselektywnym metodom syntezy peptydów. Jednakże, nawet w tym przypadku prowadzenie reakcji jednocześnie na wielu centrach jest problematyczne i zależy od wielu czynników, a przede wszystkim od zawady przestrzennej.

Wykorzystanie dendrymerów

Poliwalentność cząsteczek dendrymerów została dostrzeżona bardzo wcześnie przez chemików projektujących nowoczesne cząsteczki dla nanomedycyny. W grupie Baker'a powstała koncepcja kowalencyjnego dołączenia w jednej cząsteczce stosunkowo dużego dendrymeru PAMAM 5-tej generacji (G5) funkcji terapeutycznych (Taxol), funkcji zwiększających selektywność wobec komórek nowotworowych (reszta kwasu foliowego), oraz markera fluorescencyjnego (izocjanian fluoresceiny, FITC). Tak utworzone cząsteczki zostały przetestowane na szeregu nowotworowych liniach komórkowych. Jednakże, kilka lat temu związek ten nie został dopuszczony do etapu badań klinicznych z powodu niemożności otrzymania w procesie syntezy jednoznacznie zdefiniowanej chemicznie cząsteczki. Trzeba zauważyć, że przyłączenie zdefiniowanej liczby grup na powierzchni dendrymeru nie oznacza że wszystkie cząsteczki z danej próbki mają jednakową strukturę. Tym bardziej, że proces przebiegał wieloetapowo i polegał na przyłączeniu trzech różnych podstawników. [13]

To jednak w grupie dendrymerów peptydowych powstały pierwsze praktyczne zastosowania dendrymerów. Pokazany na Rys. 6, zbudowany na bazie dendrymeru

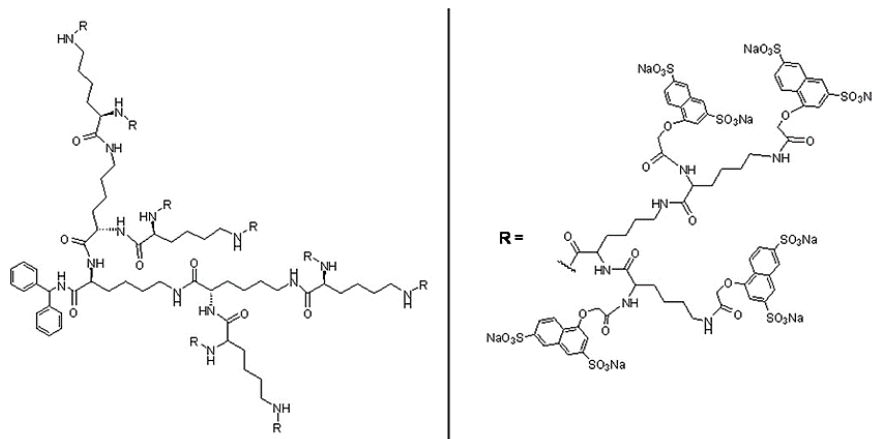
poli-lizynowego związek nazwany Gadomer-17 jest w chwili obecnej najmocniej typowanym nowym związkiem poprawiającym kontrast w obrazowaniu metodami NMR. Zawiera on na powierzchni 24 skompleksowane kationy gadolinu i pozwala na śledzenie wpływu antyangiogennych związków leczniczych na proliferację komórek nowotworowych. [14, 15]



Rys. 6. Wzór strukturalny Gadomeru-17.

Najwyżej cytowana praca dotyczy obrazowania wpływu leku o nazwie Regorafenib na wzrost komórek glejaka. [16]

Australijska firma Starpharma opracowała polianionowy dendrymer SPL7013, pokazany na Rys. 7, o strukturze zawierającej cztery biodegradowalne warstwy polilizynowe sfunkcjonalizowane 1-(karboksymetoksy)naftaleno-3,6-disulfonianem sodu (cząsteczka przyłączona do 32 grup aminowych). Związek przeszedł pomyślnie fazę badań przedklinicznych i obecnie jest testowany klinicznie w postaci żelu (VivaGel) w prewencji chorób przenoszonych drogą płciową HIV i HSV [17, 18].

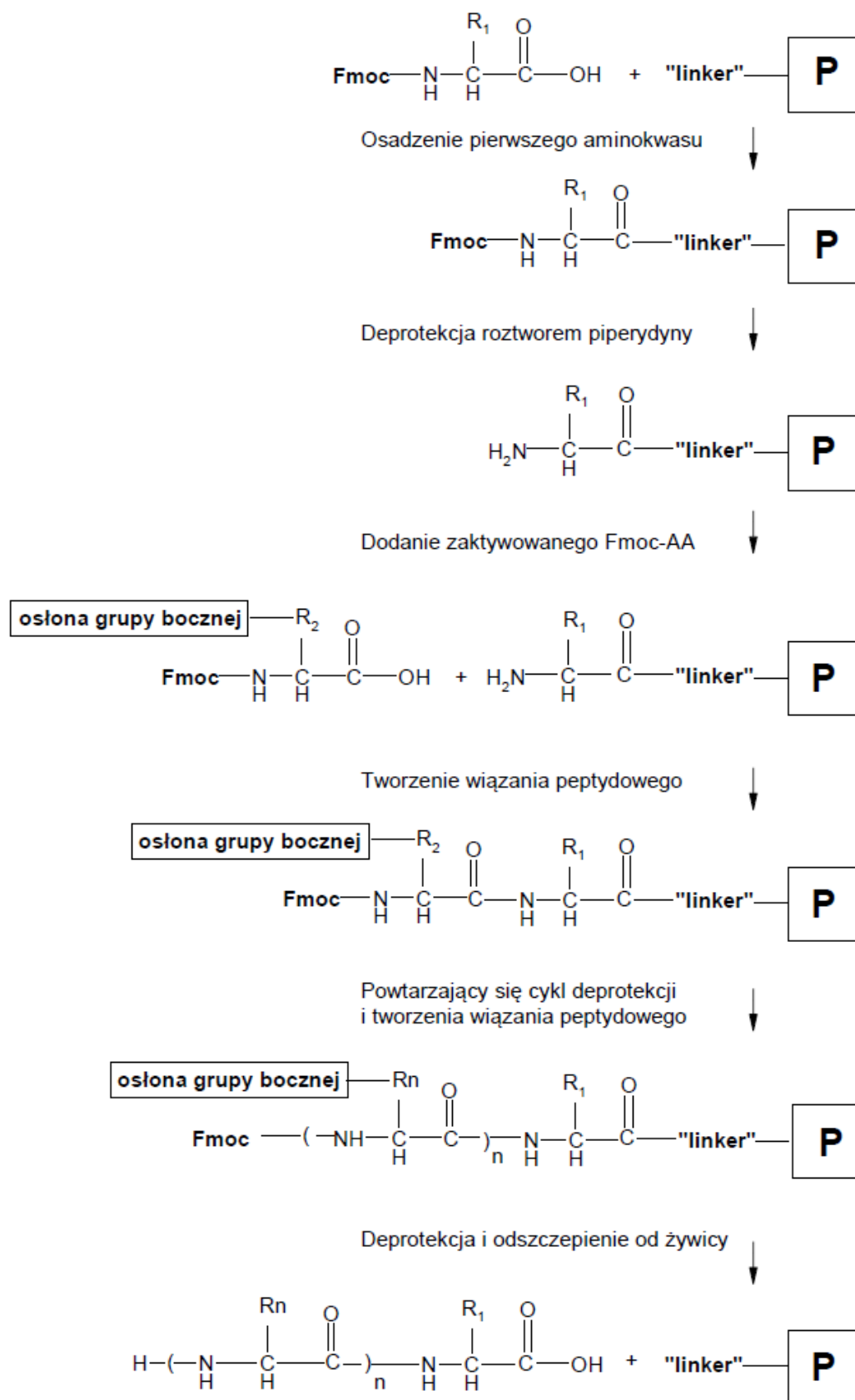


Rys. 7. Wzór strukturalny dendrymeru SPL7013. [18]

Dendrymery peptydowe zarówno pod kątem strukturalnym jak i właściwości biologicznych przypominają i naśladują naturalne peptydy obecne w organizmach roślin i zwierząt, a tym samym stanowią potencjalne związki przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe oraz mogą być nośnikami np. leków lub kwasów nukleinowych. Połączenie właściwości dendrymerów i bioaktywnych peptydów może zapewnić synergiczne działanie ze względu na: (1) poliwalentność, która może podnosić efekty biologiczne sprzężonych peptydów; (2) oddziaływanie z wieloma receptorami jednocześnie; (3) wykazywanie cech białkopodobnych w wyniku naśladowania struktur biologicznych takich jak sztuczne białka. Ponadto, takie właściwości pozwalają na nadanie ostatecznej strukturze biokompatybilności i biodegradowalności. Tak więc, dendrymery peptydowe są doskonałymi kandydatami do badań biologicznych i biomedycznych. [19]

1.3 Sposoby syntezy dendrymerów peptydowych

Dendrymery peptydowe mogą być syntezowane zarówno metodą zbieżną (najczęściej) lub rozbieżną, a syntezę prowadzi się zazwyczaj na podłożu stałym z zastosowaniem odpowiednich żywic oraz ortogonalnych grup zabezpieczających według metodologii Fmoc/tBu. Ogólny schemat syntezy peptydów na nośniku stałym przedstawia Rys. 8. Wieloetapowa synteza peptydu przebiega od C-końca do N-końca. Kolejne aminokwasy z aktywowanym C-końcem są przyłączane do N-końca zakotwiczonej na żywicy sekwencji peptydowej podczas gdy reaktywne łańcuchy boczne są tymczasowo zabezpieczone grupą ochronną. Po reakcji sprzęgania aminokwasu, żywica jest przemywana i filtrowana w celu usunięcia produktów ubocznych i nadmiaru odczynników. Następnie w wyniku procesu deprotekcji odblokowuje się grupy aminowe peptydylożywicy poprzez usuwanie grupy zabezpieczającej Fmoc (9 -fluorenylmetokycarbonyl) i ponownie przemywa się żywicę w celu usunięcia produktów ubocznych i nadmiaru odczynników. Do ostatniego aminokwasu z odblokowanymi grupami $-NH_2$ przyłączany jest kolejny C-aktywowany aminokwas. Cykl ten jest powtarzany aż do uzyskania pożądanego sekwencji peptydowej. W ostatnim etapie syntezy zazwyczaj wszystkie grupy zabezpieczające są usuwane, a peptyd jest odszczepiany od żywicy. Surowy produkt jest następnie oczyszczany zwykle za pomocą HPLC. [20]



Rys. 8. Ogólny schemat syntezy peptydów na nośniku stałym według strategii Fmoc/tBu. [21]

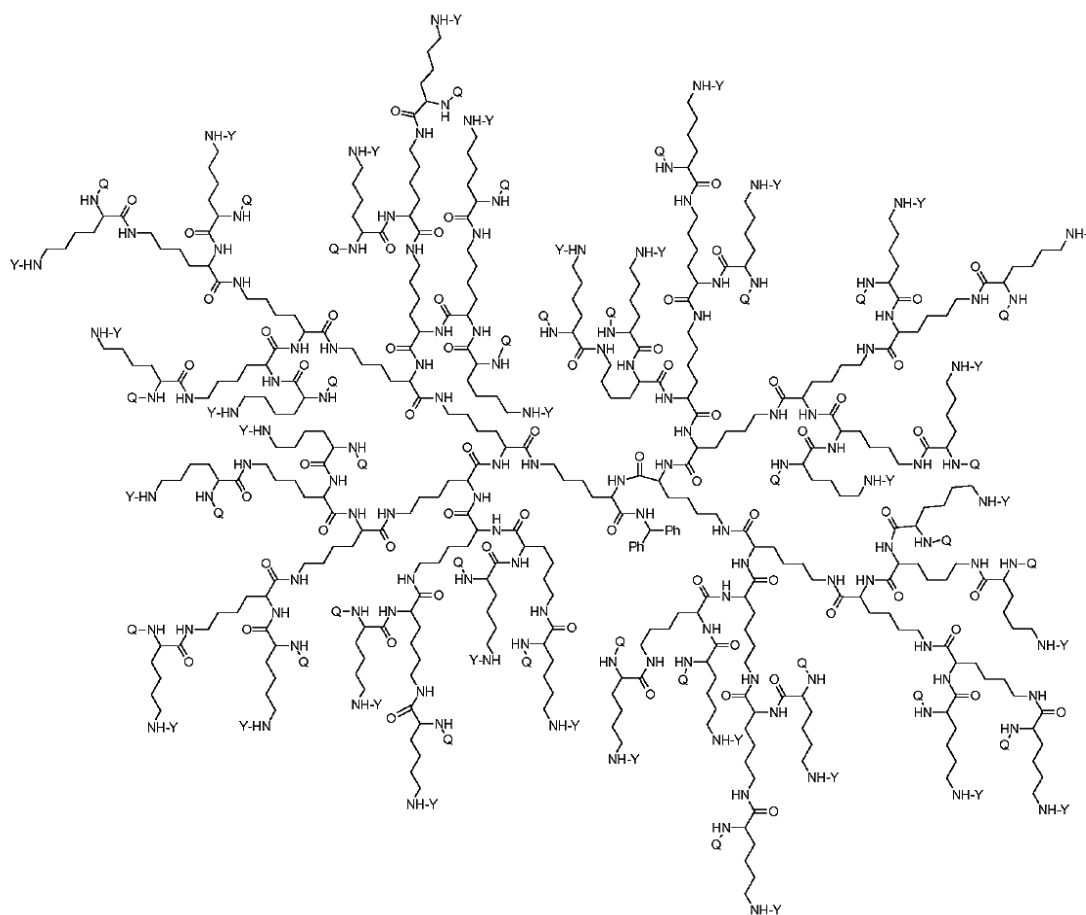
Synteza peptydowych dendrymerów pomimo wielu trudności jest również prowadzona w roztworze, szczególnie gdy pożądana jest większa ilość dendronu lub dendrymeru. Każdy etap syntezy peptydów metodą klasyczną jest czasochłonny, a szczególnie żmudny jest proces oczyszczania związków pośrednich, gdyż w przypadku związków rozgałęzionych w mieszaninie reakcyjnej poza pożądanym związkiem obecne są trudne do oddzielenia produkty uboczne o podobnych właściwościach lub zbliżonej strukturze. Często oczyszczanie związku pośredniego przebiega w kilku etapach z użyciem kolumny silikażelowej, złoża Sephadex i/lub ostatecznie za pomocą HPLC w odpowiednio dobranym gradiencie. Co ważne, przed przystąpieniem do kolejnego etapu każdy związek pośredni powinien być scharakteryzowany. Wraz ze wzrostem masy i rozbudową związku wydajność poszczególnych etapów maleje, wydłuża się czas reakcji, a procesy oczyszczania i charakteryzowania związku są coraz trudniejsze. Niemniej, możliwe jest otrzymanie finalnego związku w ilości od 0,5 g do kilku gram.

Interesującym podejściem wydaje się również połączenie obu wcześniej opisanych metod, np. w celu otrzymania dendronu lub elementu znajdującego się na obrzeżach dendrymeru prowadzi się syntezę na podłożu stałym według metodologii Fmoc/tBu, a następnie tak przygotowany związek pośredni funkcjonalizuje się lub łączy w dimer stosując metodę syntezy w roztworze według metodologii Boc/tBu, co pozwala na uzyskanie sfunkcjonalizowanego dendrymeru o pożądanym własnościach.

Dendrymery poli-L-lizynowe (PLL) będące przedstawicielem dendrymerów peptydowych były pierwszymi zastosowanymi praktycznie do wytworzenia poliwalencyjnego kompleksu z gadolinem o nazwie Gadomer stosowanego do poprawy rozdzielczości obrazowania metodami NMR [15]. Były również rdzeniem do wytwarzania związków stanowiących nośniki genów ze względu na ich doskonałą kondensację z oligonukleotydami. [22] Do ich korzystnych cech należą dobra biokompatybilność, rozpuszczalność w wodzie, biodegradowalność i elastyczność. Lizyna na obrzeżach dendrymeru PLL zawiera dwie pierwszorzędowe grupy aminowe, które są często modyfikowane w celu uzyskania lepszych właściwości biologicznych. [23]

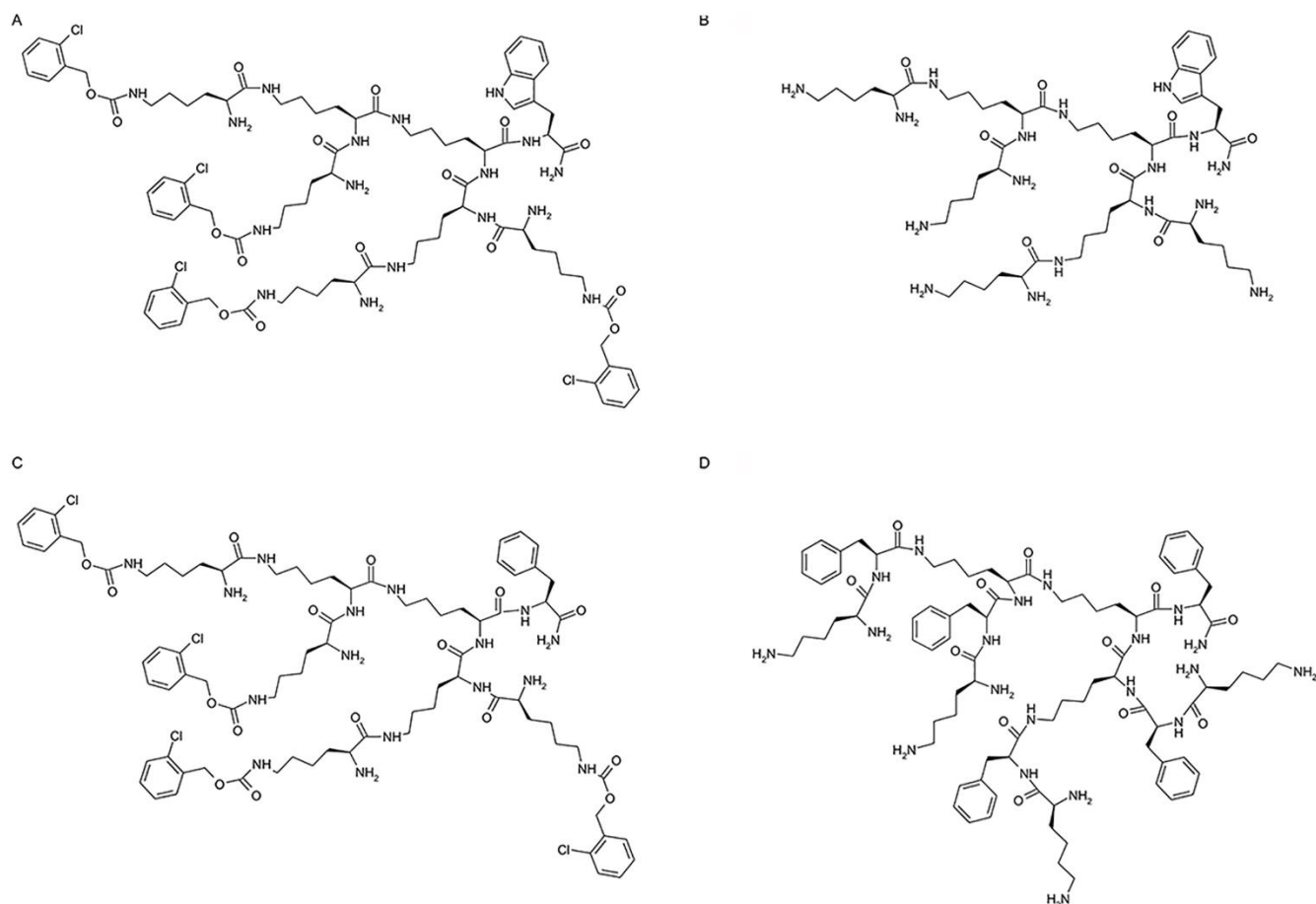
Co ciekawe, w 2018 ukazała się międzynarodowa publikacja zgłoszenia patentowego WO2018/154004 (zgłaszający Astra Zeneca), w której ujawniona została struktura dendrymerów PLL (Rys. 8) do zastosowań terapeutycznych, w szczególności w leczeniu nowotworów. Znanych jest również wiele innych zgłoszeń patentowych bądź przyznanych patentów dotyczących dendrymerów oraz ich zastosowań, co wskazuje na ich wysoki potencjał

aplikacyjny, komercjalizacyjny oraz zainteresowanie tymi związkami ze strony firm farmaceutycznych lub biotechnologicznych.



Rys. 9. Struktura dendrymeru ujawniona w zgłoszeniu patentowym WO2018/154004.

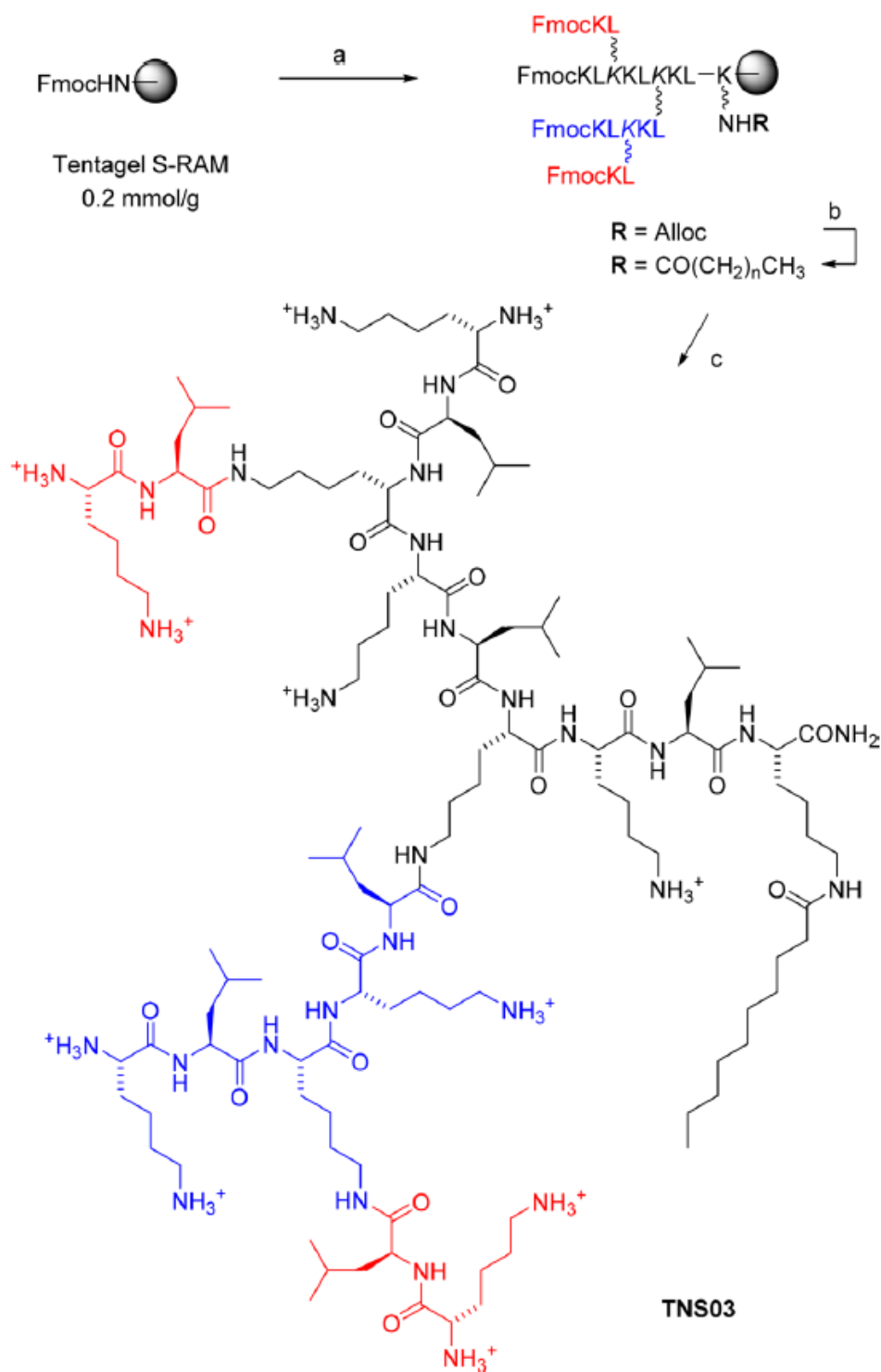
Oprócz dendrymerów PLL otrzymuje się również dendrony PLL, które mogą być dodatkowo sfunkcjonalizowane. W publikacji Janiszewska i wsp. przedstawiono cztery amfifilowe polilizynowe dendrony drugiej generacji, które użyto do transfekcji komórek glejaka U87 i C6. Syntezę dendronów przeprowadzono wykorzystując nośnik stały tj. żywicę Rink Amide AM z obsadzeniem 0.71 mmol/g oraz stosując HATU jako odczynnik sprzęgający. [24] Struktury otrzymanych związków pokazano na Rys. 10.



Rys. 10. Struktury amfifilowych polilizynowych dendronów drugiej generacji. [24]

Poza wspomnianymi dendrymerami PLL otrzymuje się również inne typy zmodyfikowanych dendrymerów peptydowych w połączeniu z innymi cząsteczkami np. lipidami [25] czy cukrami [26], a nawet z przeciwciałami. [27]

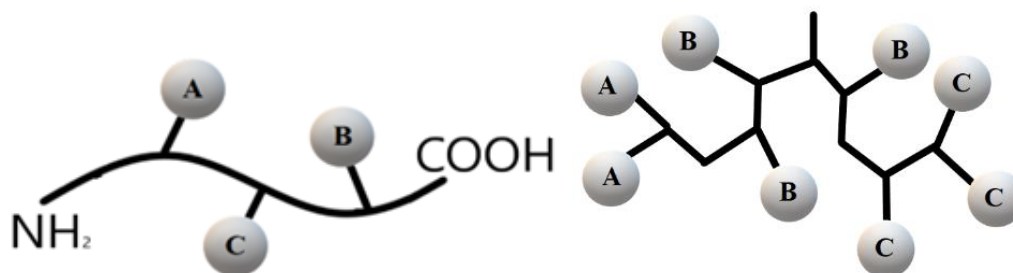
W publikacji Thissa N. Siriwardena i wsp., autorzy przeprowadzili syntezę dendrymerów peptydowych drugiej generacji (G2) zawierających łańcuch kwasu tłuszczowego w rdzeniu dendrymeru, które skutecznie zabijają bakterie Gram-ujemne, w tym *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, dwie najbardziej problematyczne bakterie lekooporne na świecie. Synteza dendrymerów była prowadzona na nośniku stałym z zastosowaniem żywicy Tentagel S-RAM o stopniu obsadzenia 0,2 mmol/g według standardowej metodologii Fmoc/tBu. [28]



Rys. 11. Synteza dendrymeru peptydowego zawierającego kwas tłuszczowy; a) SPPS, b) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 w DCM, następnie kwas dekanowy, HOBt, DIC, DIPEA, c) 20% TFA w DMF, odszczepianie od żywicy za pomocą TFA i oczyszczanie przy zastosowaniu HPLC. [28]

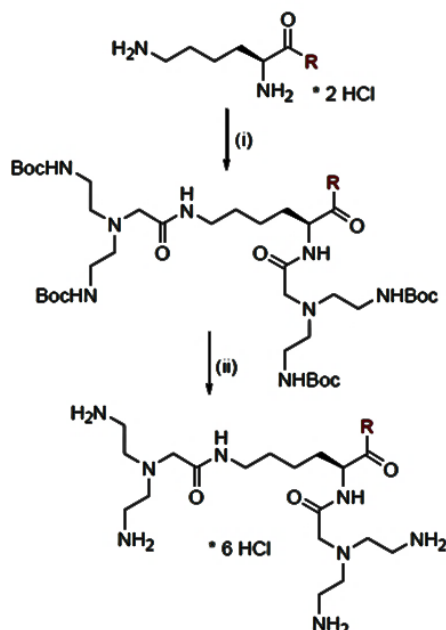
1.4 Koncepcja nieciągłego farmakoforu w zastosowaniu do projektowania biologicznie aktywnych dendrymerów peptydowych

W roku 2007 powstała w naszym zespole koncepcja „niesekwencyjnego farmakoforu”, która zakłada, że na powierzchni i w drzewie dendrymeru można generować aktywne biologicznie struktury drugorzędowe liniowych peptydów o różnych własnościach [29].



Rys. 12. Graficzne przedstawienie ciągłego i „niesekwencyjnego farmakoforu”.

W szczególności, dotyczy to możliwości generowania struktur drugorzędowych z naturalnych peptydów w których sekwencji istnieją wielokrotne powtórzenia jednego aminokwasu. Wielokrotne kopie tego aminokwasu występujące na powierzchni dendrymeru mogłyby znajdować się w takiej stereochemicznej relacji jak w aktywnych biologicznie drugorzędowych strukturach liniowego peptydu. Można także za pomocą dendrymeru zaprojektować mimikrę pewnych cech ogólnych cząsteczek, np. ich amfiflowość, kationowość, itp. Takie założenia były podstawą do zaprojektowania kilku grup amfifilowych związków o charakterze peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Pomocne w tym procesie były liczne prace nad charakterystyką strukturalną i aktywnością biologiczną naturalnych peptydów prowadzone przez wiele grup na świecie. Wykorzystanie tej wiedzy pomogło nam na eksperymentalne dobranie struktury drzewa dendrymeru, optymalnej do niespecyficznego oddziaływania z membraną drobnoustrojów co jest podstawą aktywności naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Aby zapewnić unikalność oraz przewidywaną ochronę patentową projektowanych związków punktem wyjścia była modyfikacja wyjściowego aminokwasu w kierunku zwiększania ilości rozgałęzień co pokazano na Rys. 13.



Rys. 13. Przykład syntezy nowych rdzeni z zasadowych aminokwasów. Synteza rdzeni: heksachlorowodoroków *N,N'*-bis{[bis(2-aminoetylo)amino]metylokarbonylo}amidów *L*-lizyny (i) DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Otrzymano kilka grup różnych strukturalnie dendrymerycznych peptydów, które w zależności od struktury wykazywały albo szerokie spektrum działania na drobnoustroje Gram-dodatnie, Gram-ujemne i grzyby albo selektywność wobec szpitalnych odpornych na antybiotyki szczepów Gram-ujemnym *E. coli* [30] czy grzybów z gatunku *Candida*. [31, 32]

Ich cechą wspólną była strukturalna amfifilowość i rozlokowanie w różnych punktach dendrymeru kationowych grup. Równoległe prowadzone prace nad mechanizmem ich działania pokazały, że poza niespecyficznym oddziaływaniem z membranami komórek drobnoustrojów wykazują także mechanizmy inhibitorowe np. blokujące budowę ścian komórek lub zmniejszające wirulencję.[32]

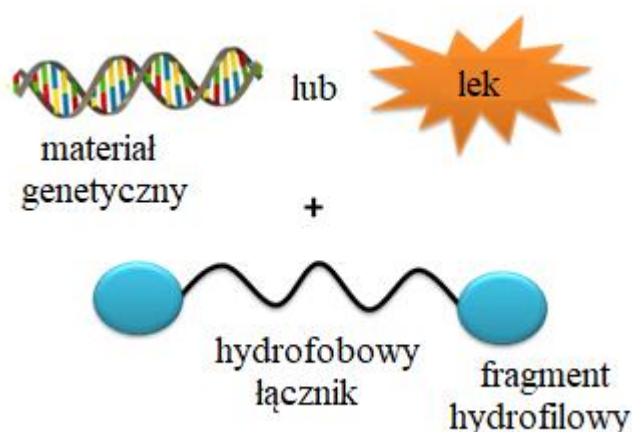
Ostatnie szerokie badania zależności sekwencji naturalnych peptydów od ich różnorodnych zadań w organizmach żywych zwróciły naszą uwagę na naturalne peptydy aktywne wobec komórek nowotworowych układu nerwowego, przede wszystkim glejaka. Nowotwory mózgu są prawdziwą plagą XXI wieku. W przypadku glejaka rokowania przeżycia od momentu diagnozy są na poziomie poniżej roku. Składa się na to bariera krew-mózg zmniejszająca liczbę dostępnych farmaceutyków do dwóch, szybkie powstawanie lekooporności, a także duża inwazyjność tego nowotworu. Dostępne terapie to kombinacja chirurgii, chemoterapii z użyciem temozolomidu i karmuzyny i radioterapii. Dlatego wciąż

poszukuje się nowych leków i nowych strategii leczniczych. Jednym z podejść nad którymi pracuje wiele laboratoriów to terapia genowa [33].

W swojej pracy postanowiłem skoncentrować się na dwóch aspektach - wykorzystanie koncepcji nieciągłego farmakoforu do zaprojektowania rozgałęzionych związków peptydowych o takiej strukturze aby były aktywne przeciw glejakom oraz zbadanie czy można je użyć jako nośniki leków (terapia konwencjonalna) lub fragmentu leczniczego siRNA (terapia genowa).

2. Dendrymery typu „bola”

Dendrymery typu „bola” są to dimeryczne układy, w których dwa sfunkcjonalizowane fragmenty („głowy”) są połączone ze sobą odpowiednim organicznym, na ogół hydrofobowym, trwałym lub biodegradowalnym łącznikiem (Rys. 14). W naturze, podobny typ architektury można znaleźć głównie w błonach niektórych rodzajów ekstremofilnych archaebakterii. W tym przypadku związki bolaamfifilowe zapewniają lepszą stabilność fosfolipidowej membrany w trudnych warunkach zewnętrznych. [34,35].



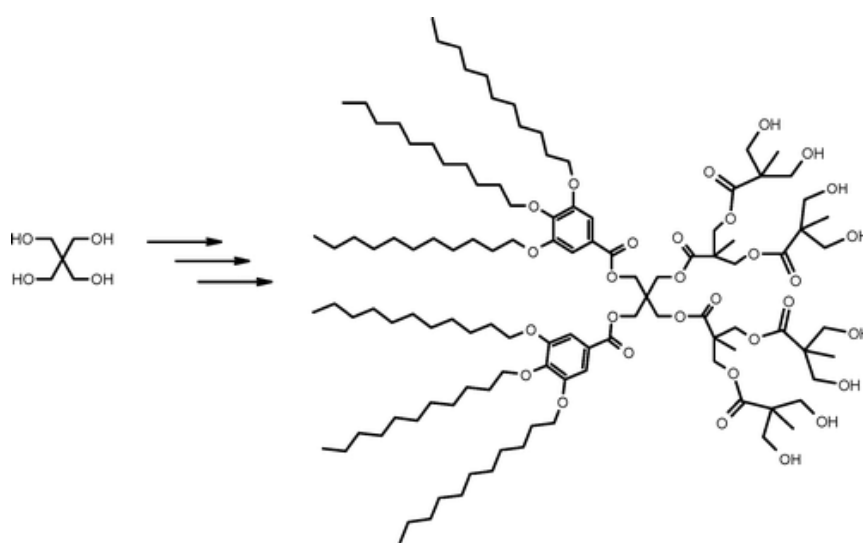
Rys 14. Dendrymer typu „bola” oraz możliwość stworzenia przez niego kompleksu z materiałem genetycznym lub lekiem.

Początkowo, układy typu „bola” pojawiły się w literaturze naukowej jako supramolekularne kompleksy związków o amfifilowej strukturze, np. pomiędzy liniowymi cząsteczkami a cyklicznymi układami typu kaliksarenów [36, 37] czy eterów koronowych (np. rotaksany). [38]

Dzięki amfifilowym składnikom, po utworzeniu supramolekularnej struktury z wykorzystaniem oddziaływań jonowych, możliwości tworzenia wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych lub typu pi-pi, itp., układy „bola” mogą ulegać dalszej samoorganizacji tworząc znane w biologii molekularnej mono- i poliwarstwy (obecne np. w strukturach komórkowych), micelle, układy ciekłokrystaliczne, itp. To właśnie dzięki zdolności do mimikry znanych z natury superstruktur związki takie cieszą się dużym zainteresowaniem.

W naukach medycznych dendrymery typu „bola” były badane jako potencjalne nanonośniki leków lub materiału genetycznego. Ponadto odkryto, że taka unikalna struktura poprawia stabilność tworzonych kompleksów oraz wydajność transfekcji tj. procesu wprowadzenia obcego DNA lub RNA do komórki eukariotycznej. [38]

Pomimo faktu, że według Web of Science w ostatnich 10-ciu latach ilość cytowań prac ze słowem „bola” systematycznie rośnie, obecnie w literaturze naukowej pojawia się niewiele doniesień o nowych dendrymerach typu „bola”. Głównie dlatego, że w literaturze „dendrymerowej”, związki takie definiowane są jako „dendrymery typu Janus”. Taka architektura cząsteczki polega na umieszczeniu najczęściej dwóch różnych strukturalnie i różnie sfunkcjonalizowanych dendronów po dwóch stronach najczęściej krótkiego łącznika. Zwiększa to możliwości wprowadzenia różnych grup funkcyjnych do tych już polifunkcyjnych cząsteczek. Ideę tą pokazuje pierwsza praca norweskich autorów, która ukazała się w roku 2004. [39]

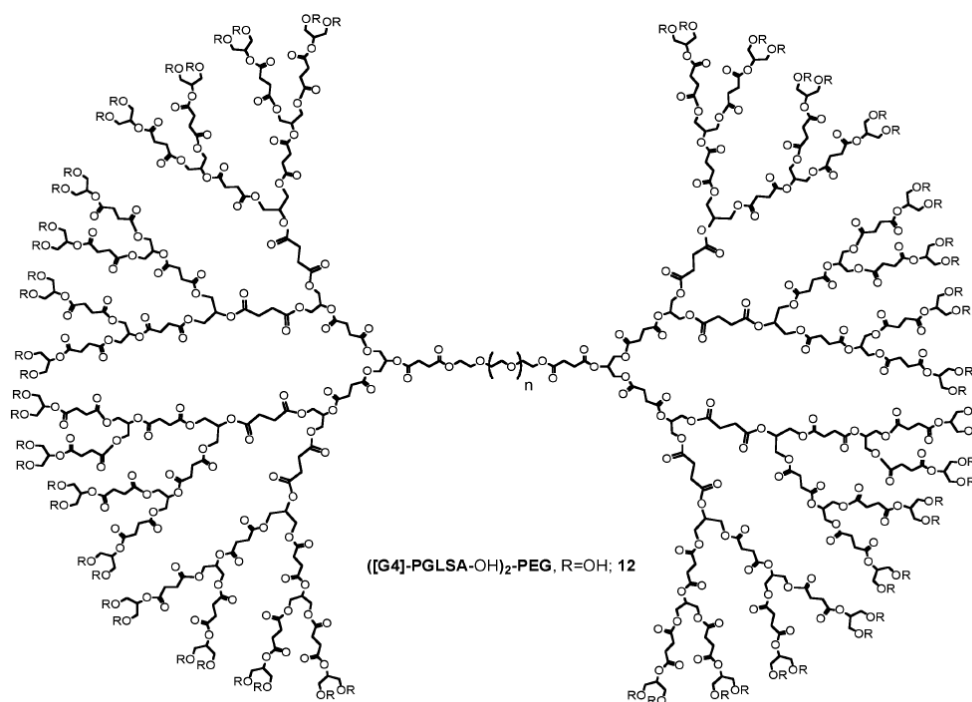


Rys. 15. Bis-funkcjonalne dendrymery Janus. [39]

Interesujące jest, że powyższe stosunkowo niewielkie cząsteczki z krótkim łącznikiem otrzymane przez kombinację metody rozbieżnej i zbieżnej z zastosowaniem ortogonalnych grup zabezpieczających otrzymano ze stosunkowo dużymi jak na związki dendrymeryczne wydajnościami (ok. 60 %). Jak pokazały wczesne prace pochodzące z grupy Virgila Percec’a [40,41,42], a następnie J.P. Majoral’a [43] wykorzystanie architektury „bola” pozwala na otrzymanie amfifilowych struktur do generowania supramolekularnie związanych superstruktur o ciekawych własnościach fizykochemicznych co daje możliwości ich wykorzystania w chemii materiałowej lub nanomedycynie.

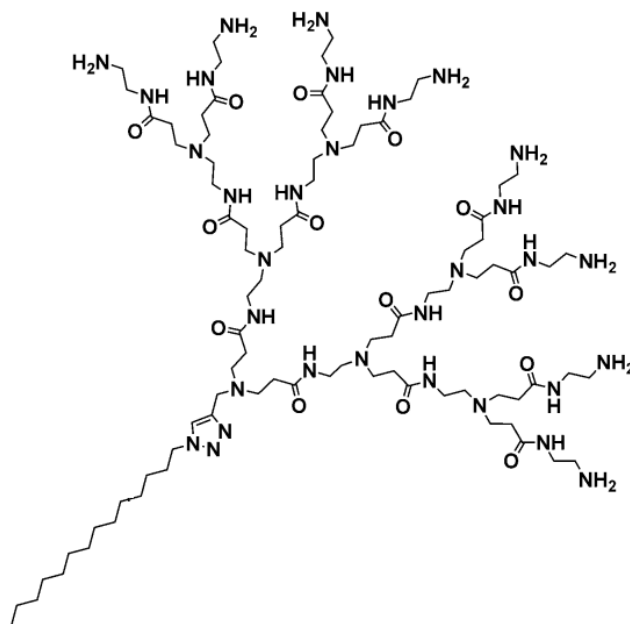
Pierwsza praca w której opisano syntezę liniowo-dendrytycznych makrocząsteczek typu „bola” czwartej generacji z wykorzystaniem wysokowydajnej metody rozbieżnej pochodzi z 2006 roku. [44] Prezentowane makrocząsteczki składają się z nieimmunogennego rdzenia - liniowego poliglikolu etylenowego oraz dendronów powstałych z kwasu bursztynowego

i glicerolu połączonych wiązaniami estrowymi w architekturze triblokowej (Rys. 16). Jako element rozgałęziający stosowano bezwodnik monoestru kwasu bursztynowego, a reakcję sprzężenia prowadzono za pomocą DCC w obecności DMAP i DCM. Autorzy szczegółowo scharakteryzowali otrzymane związki oraz monitorowali postęp przebiegających reakcji za pomocą MALDI-TOF, SEC oraz NMR, a ponadto przeprowadzili badania toksyczności komórkowej na komórkach śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej.



Rys. 16. Struktura dendrymeru zbudowanego z liniowego poliglikolu etylenowego oraz dendronów powstałych z kwasu bursztynowego i glicerolu. [44]

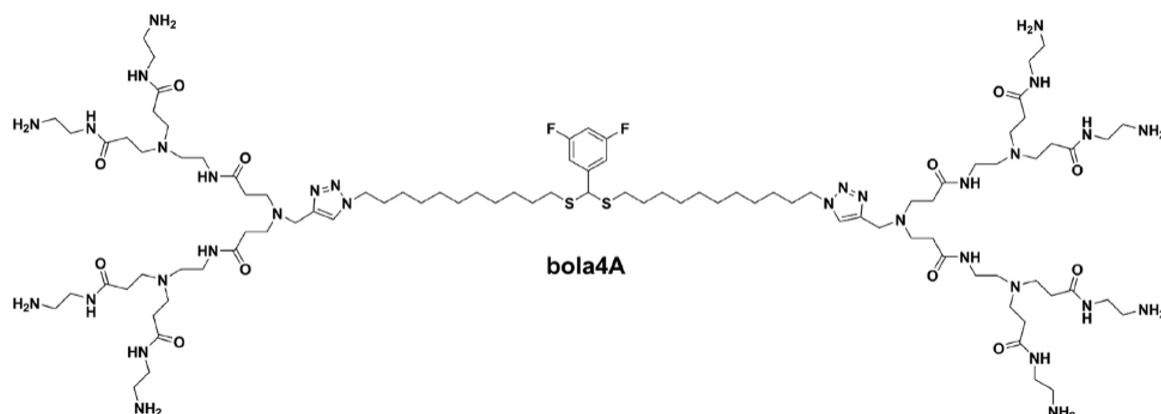
Natomiast pierwsza publikacja traktująca o potencjalnym zastosowaniu amfifilowego związku łączącego w sobie zarówno korzystne właściwości dendronu PAMAM jak i grupy lipidowej, do efektywnego dostarczania małego interferującego RNA - siRNA i wyciszania odpowiadającego mu genu *in vitro* i *in vivo* pochodzi z 2012 roku. [45] Autorzy otrzymali amfifilowy związek posiadający hydrofobowy łańcuch alkilowy i hydrofilowy dendron PAMAM z siedmioma trzeciorzędowymi aminami we wnętrzu i ośmioma aminami pierwszorzędowymi na końcach, który łączy w sobie korzystne cechy podjednostek lipidowych i dendrymerowych (Rys. 17). Taka struktura umożliwia utworzenie enzymatycznie trwałego kompleksu z odpowiednim fragmentem siRNA (HSP 27 siRNA), dostarczenie go do komórki, a następnie uwolnienie kwasu nukleinowego z silnym efektem wyciszenia genów odpowiedzialnych za proliferację *in vitro* oraz *in vivo* w modelu raka prostaty.



Rys. 17. Amfifilowy związek zbudowany z dendronu PAMAM i hydrofobowej grupy lipidowej. [45]

Zespół kierowany przez L. Peng w artykule z 2016 r. [46] przedstawił fluorowany amfifilowy dendrymer typu „bol”a zaprojektowany jako redox-czuły nośnik siRNA (Rys. 18). Wysoki poziom reaktywnych form tlenu (ROS – ang. Reactive Oxygen Species), charakterystyczny dla wielu komórek nowotworowych jest tutaj czynnikiem degradującym kompleks w komórce. Otrzymany amfifilowy dendrymer „bola” posiada wrażliwą na ROS grupę tioacetalową, która znajduje się w centralnym hydrofobowym rdzeniu cząsteczki oraz dwa kationowe dendrony typu PAMAM na końcach. Nośnik tworzy niekwalencyjny kompleks z ujemnie naładowanym siRNA, chroni kwas nukleinowy przed enzymami trawiącymi oraz przenosi go selektywnie do komórki nowotworowej. W komórce nowotworowej nośnik jest efektywnie rozkładany na fragmenty, a kwas nukleinowy jest uwalniany. Na uwagę zasługuje również obecność znaczników fluorowych wewnątrz tego dendrymeru, co umożliwia śledzenie procesu tworzenia i rozkładu kompleksu przy użyciu technik ^{19}F NMR. Wrażliwość dendrymeru na ROS zwiększa wydajność rozkładu kompleksu siRNA/nośnik w komórkach nowotworowych, a tym samym umożliwia efektywne dostarczanie siRNA i wyciszanie genów. Opracowany związek korzysta z połączonych zalet wektorów lipidowych i dendrymerowych, a także oferuje unikalną możliwość osiągnięcia kontrolowanego uwalniania siRNA w celu efektywnego wyciszania genów w komórkach nowotworowych poprzez wykorzystanie wysokiego poziomu wewnątrzkomórkowych ROS. Przedstawione wyniki wskazują również na możliwość projektowania fluorowanych

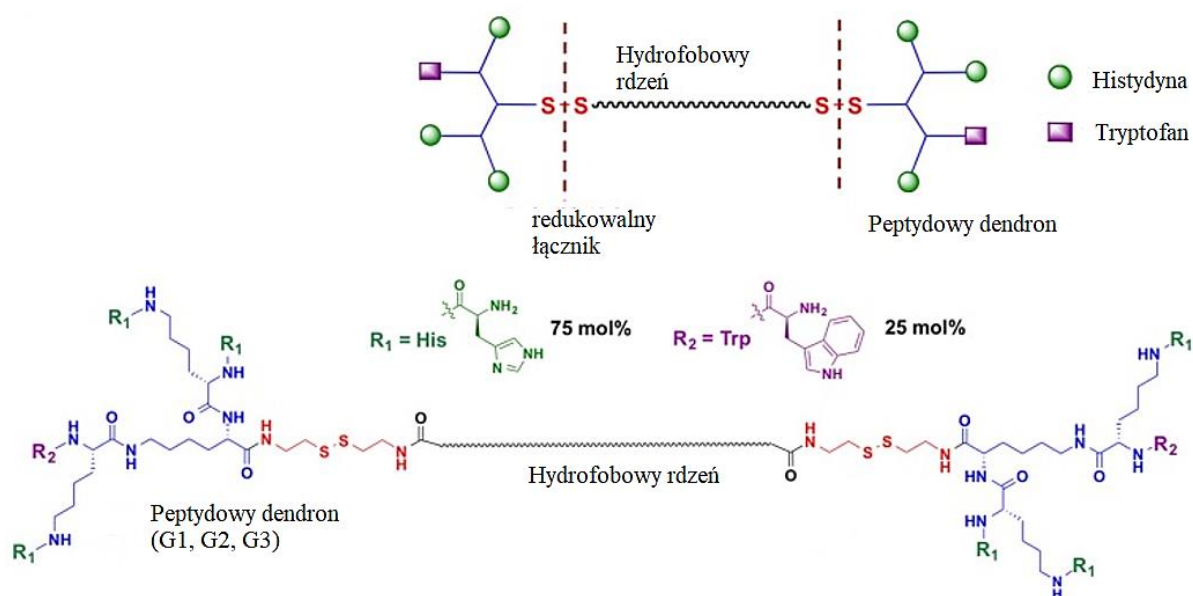
dendrymerów oraz wykorzystanie ich zarówno do wykrywania nowotworów jak i leczenia chorób nowotworowych.



Rys. 18. Struktura fluorowanego amfifilowego dendrymeru typu „bola”. [46]

W publikacji Hanxiang Zeng i wsp. [47] przedstawiono peptydowe dendrymery typu „bola” zawierające w swojej budowie hydrofobowy łańcuch oraz dendrony 1-szej, 2-giej oraz 3-ciej generacji zbudowane z lizyny i sfunkcjonalizowane w 75 % mol histydyną (His) i 25 % mol tryptofanem (Trp) (Rys. 19). Dodatkowo naładowane dendrony zapewniały efektywne oddziaływanie związku z siRNA oraz tworzenie kompleksu. Wszystkie cząsteczki zostały zsyntetyzowane według klasycznej metody syntezy peptydów w roztworze. Autorzy poprzez systematyczną zmianę kilku parametrów molekularnych, takich jak długość, geometria i charakter chemiczny rdzenia badali różnorodne rdzenie hydrofobowe np. zawierające w strukturze parzystą liczbę grup CH_2 , grupy CF_2 , mostki polietylenowe lub 1,2,3-triazol. Finalne związki posiadały w swojej strukturze również mostki disiarczkowe, które zapewniają rozpad kompleksów w warunkach redoks. W wyniku porównania związków monoamfifilowych i bolaamfifilowych pod kątem aktywności wyciszania genów w komórkach fibroblastów NIH 3T3 z wykorzystaniem zielonej fluorescencji naturalnego białka GFP jako markera fluorescencyjnego oraz na podstawie uzyskanych w pracy danych eksperymentalnych, przeprowadzono analizę zależności wydajności dostarczania siRNA od struktury związku. Okazało się że, w porównaniu z badanymi związkami monoamfifilowymi, wszystkie bolaamfifile drugiej generacji (G2) o podobnej długości wykazały silniejsze wiązanie siRNA, zmniejszoną cytotoksyczność i znacznie zwiększoną wydajność transfekcji. Ponadto, zaobserwowano, że wielkość kationowego dendronu ma istotny wpływ na morfologię i aktywność biologiczną kompleksów. Obydwa kompleksy siRNA utworzone z łącznikiem C_{18} – dendrymer „bola” drugiej generacji z łącznikiem C_{18} , jak i dendrymer „bola” trzeciej

generacji z łącznikiem C₁₈ wykazały znaczący wychwyty komórkowy, przy czym dendrymer G2 wykazywał wyższą wydajność transfekcji. Można to intuicyjnie przypisać większej stabilności i mniejszym rozmiarom kompleksów z „głową” niższej generacji (G2). Co ciekawe, dendrymer „bola” drugiej generacji z łącznikiem C₁₈ i fluorowana pochodna dendrymeru (bola-F10-G2) wykazywały 20-40 razy wyższą wydajność transfekcji niż lipofektamina. Lipofektamina jest to stosowany w biologii molekularnej odczynnik do transfekcji, który zawiera podjednostki lipidowe, które w środowisku wodnym mogą tworzyć liposomy. Ponadto, zastosowanie rdzenia fluorowęglowego, w przeciwieństwie do węglowodorowego, znacznie zwiększyło zarówno skuteczność transfekcji, jak i stabilność kompleksów w surowicy, co sugeruje, że dalsze badania nad nośnikami opartymi na fluorowęglach mogą okazać się szczególnie korzystne.

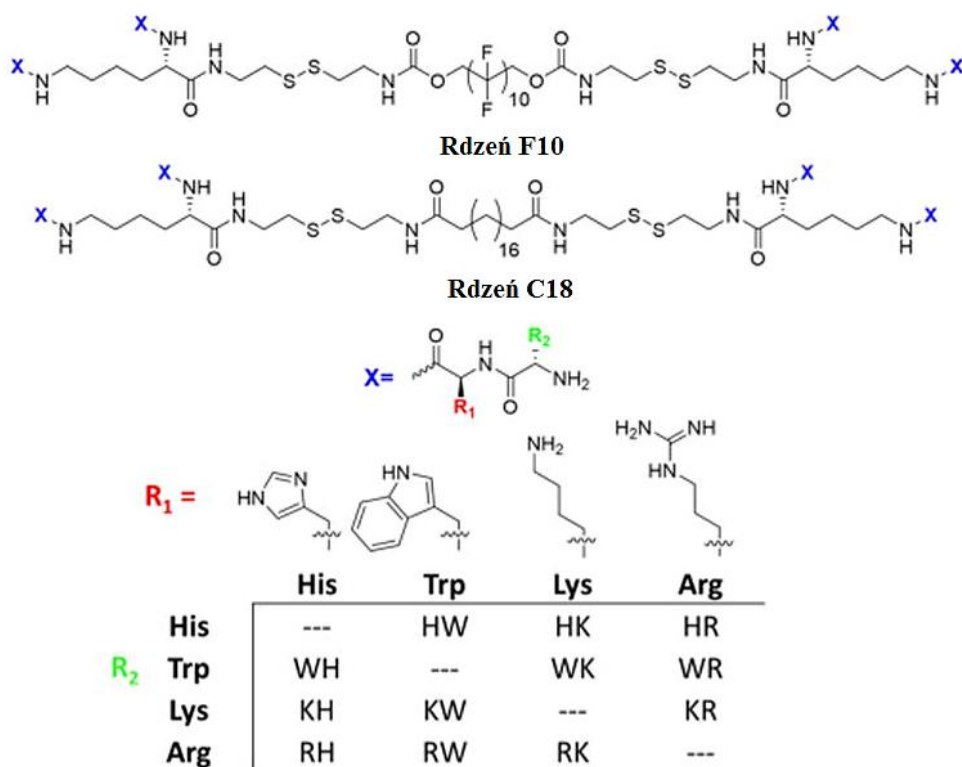


Rys. 19. Peptydowe dendrymery typu „bola” przedstawione w publikacji Hanxiang Zeng i wsp. [47]

Najważniejszy wniosek wynikający z powyższej pracy to zrozumienie, iż unikalna struktura związków bolaamfifilowych jest kluczowym czynnikiem wpływającym na stabilności kompleksu z siRNA, niską cytotoksyczność, aktywność hemolityczną oraz wysoką wydajność transfekcji i poziom wyciszenia genu.

W publikacji Alexander C. Eldredge i wsp. [48] autorzy poszukując nośników do wydajnej transfekcji siRNA przedstawili sposób syntezy nowych bolaamfifilowych peptydowych dendrymerów o czterech ramionach, poprzez skonstruowanie biblioteki 12 dipeptydów z wykorzystaniem czterech aminokwasów: L-argininy, L-histydyny, L-lizyny i L-tryptofanu (Rys. 20). W kolejnym etapie zostały one przyłączone do dwóch dendrytycznych

rusztowań bolaamfifilowych. Te cztery aminokwasy zostały wybrane ze względu na swoje szczególne właściwości – Arg i Lys dostarczają ładunki dodatnie niezbędne do wiązania z anionowym siRNA, His ma zdolność do zwiększania w jądrze ilości transportowanego siRNA poprzez zwiększony rozład endosomu. Natomiast Trp może odgrywać krytyczną rolę w wiązaniu siRNA w wyniku interkalacji pierścienia indolowego Trp pomiędzy pary zasad w siRNA. Syntezy prowadzone były według klasycznej metodologii syntezy peptydów w roztworze, a jako odczynnik sprzęgający stosowano PyBOP (heksafluorofosfonian (benzotriazol-1-iloxy) tripirolidynofosfoniowy). Uzyskane związki zostały zbadane pod kątem dostarczania siRNA *in vitro* w komórkach HEK-293 i HeLa. Bolaamfifile funkcjonalizowane dipeptydami zawierającymi Arg lub His były najbardziej efektywne w dostarczaniu siRNA *in vitro*, Arg zapewniała dodatkowy ładunek dodatni, co zwiększało trwałość kompleksu z siRNA i zarazem wychwytywanie komórkowe, a His ułatwiała ucieczkę endosomalną mając tym samym korzystny wpływ na proces wyciszenia genu.



Rys. 20. Stuktura bolaamfifilowych peptydowych dendrymerów o czterech ramionach.[48]

3. Dendrymery jako nanonośniki

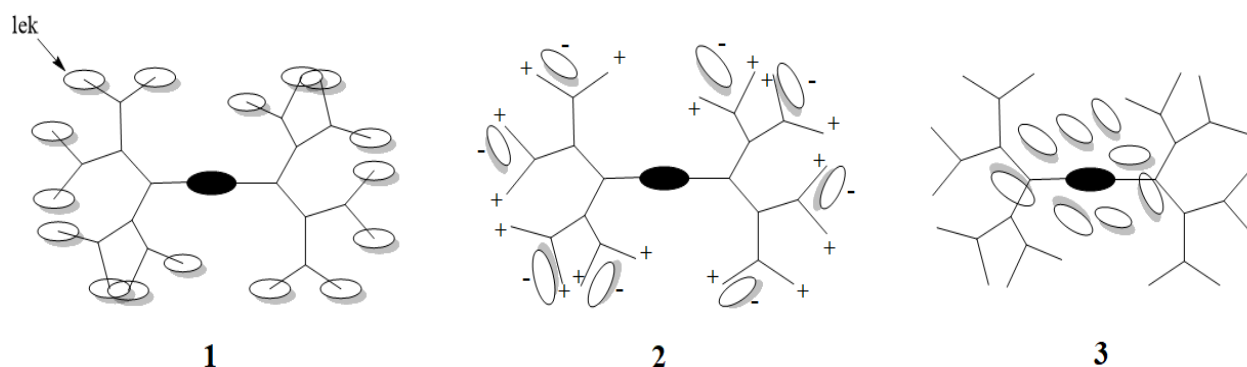
Choroby nowotworowe stanowią drugą przyczynę zgonów na świecie. Pomimo znacznego postępu w dziedzinie medycyny i biotechnologii, obecne terapie nowotworów są niewystarczające. Nadal poszukuje się skutecznych i mało inwazyjnych sposobów leczenia. Terapie oparte na inteligentnym dostarczaniu leków lub krótkich fragmentów siRNA (zwana terapią genową) stanowi obecnie jeden z najnowocześniejszych i najciekawszych kierunków badań w nanomedycynie.

Początkowo wiązano duże nadzieje z nośnikami wirusowymi (adenowirusy), jednak okazały się one kandydatami o małym bezpieczeństwie i dużym ryzyku ze względu na znaczną immunogenność oraz wywoływanie wielu skutków ubocznych. Biorąc pod uwagę powyższe, powstała opinia, że wirusy należy zatem zastąpić syntetycznymi nanocząsteczkami zdolnymi do transportowania leków lub materiału genetycznego. Oczekuje się, że oparte na nanotechnologii nowe techniki dostarczania leków przyniosą postęp w leczeniu chorób nowotworowych poprzez zwiększenie skuteczności już znanych leków przeciwnowotworowych, przezwyciężenie lekooporności i zmniejszenie toksyczności leków.

Dendrymery, biorąc pod uwagę ich unikalne właściwości (trójwymiarowa struktura, poliwalentność oraz możliwość wprowadzania różnych ugrupowań) są więc odpowiednimi związkami do zastosowania jako nanocząsteczki do dostarczania leków lub materiału genetycznego. Ponadto, dendrymery o małych rozmiarach mogą wnikać głębiej i uzyskać bardziej rozległą dystrybucję tkankową niż nanocząstki o konwencjonalnej wielkości (ok. 100 nm).[49]

Co więcej, lek może zostać przyłączony do dendrymeru na 3 różne sposoby (Rys. 21):

- 1) za pomocą wiązań kowalencyjnych,
- 2) w wyniku oddziaływań elektrostatycznych lub
- 3) poprzez enkapsulację.

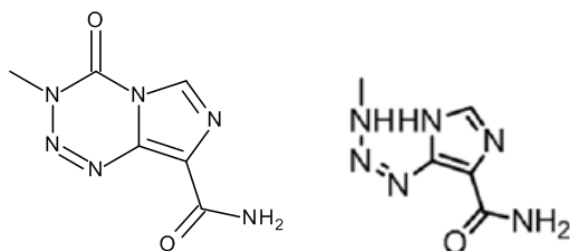


Rys. 21. Sposoby przyłączenia leku do dendrymeru typu „bola”.

Wybór struktury lek-dendrymer jest uzależniony od właściwości leku oraz rodzaju zmian patologicznych.

Glejaki są jednymi z najbardziej agresywnych i trudnych do leczenia nowotworów złośliwych u ludzi, które charakteryzuje szybka proliferacja i duża inwazyjność. Jednocześnie brakuje odpowiednich leków, stąd skuteczność konwencjonalnych chemioterapii glejaka jest stosunkowo niska bądź wiąże się z wieloma efektami ubocznymi. Istnieje więc potrzeba opracowania nowych i skutecznych rozwiązań terapeutycznych, które będą także bezpieczne dla pacjentów.

Temozolomid (TMZ) to nieaktywny farmakologicznie prolek o właściwościach alkilujących (metylacja DNA), który przekracza barierę krew mózg (ang. blood-brain barrier - BBB) po podaniu doustnym. W układzie naczyniowym w fizjologicznym pH ulega on szybkiemu przekształceniu do aktywnego metabolitu o działaniu przeciwnowotworowym.[50] Ten lek wykazał szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego wobec glejaka, nawracającego glejaka wielopostaciowego, zaawansowanego czerniaka złośliwego i dziecięcych guzów litych.[51] W Stanach Zjednoczonych, jest to farmaceutyk zalecany jako chemioterapeutyk pierwszego rzutu w leczeniu glejaków złośliwych (np. glejak wielopostaciowy, gwiazdziaak anaplastyczny). [52]



Rys. 22. Wzór temozolomidu i jego metabolitu o działaniu przeciwnowotworowym.

Niestety, pomimo pożądanego działania przeciwnowotworowego wobec glejaków, TMZ jest wysoce cytotoksyczny i wykazuje szereg działań niepożądanych, w tym może wykazywać działanie mutagenne, a także przyczyniać się do wystąpienia wtórnych nowotworów. Dlatego niezwykle istotne jest opracowanie odpowiednich nośników dla tego rodzaju leków.

W literaturze można znaleźć publikacje na temat potencjalnego zastosowania różnych dendrymerów do celowego dostarczania leków (np. doksorubicyny, docetakselu, paclitakselu) do nowotworów, w tym np. nowotworów mózgu. Istniejące artykuły dotyczą najczęściej dendrymerów PAMAM ze względu na ich powszechność, dobrze przebadane właściwości oraz dobrze opracowane strategie syntezy. Poza publikacją Ugir Hossain Sk i wsp., nadal brakuje rzetelnych danych na temat układów dendrymer/temozolomid. W publikacji tej przedstawiono dendrymer PAMAM, który autorzy poddali sprzężeniu z TMZ otrzymując koniugat dendrymer-temozolomid. Koniugat został przebadany wobec chłoniaka u myszy i stwierdzono, iż znacząco zmniejsza on wzrost guzów litych i zwiększa długość życia, podczas gdy u nieleczonych myszy rozwijały się rozległe przerzuty doprowadzające do śmierci. [53]

Próbowano otrzymać niekowalencyjne połączenia temozolomidu, tzn. kompleksować go z polilaktydo-glikolidem (PLGA) [54], nanoliposomami polimerowymi [55] czy też z chitosanem i cyklodekstryną [56]. W publikacji Sarah M. Ward i wsp. [57] opisano serię koniugatów polimer-temozolomid na bazie 2-metakryloiloksyetylofosforylocholino (MPC). Koniugaty te wykazywały zwiększoną stabilność hydrolityczną w porównaniu do wolnego TMZ oraz cytotoksyczność wobec testowych komórek U87MG.

Warto zauważyć, iż obecnie trwają prace prowadzone przez firmę Starpharma nad koniugatem dendrymeru PLL i docetakselu (DEP®) o dużym potencjale komercjalizacyjnym. Badania przedkliniczne wykazały, że koniugat osiągnął znacząco lepsze efekty cytotoksyczne w wielu typach nowotworów w porównaniu do samego leku sprzedawanego pod nazwą handlową Taxotere®. Docetaksel to chemioterapeutyk, który wykazuje działanie cytostatyczne poprzez hamowanie podziałów komórkowych. Niestety stosowanie tego leku wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych, szczególnie w przypadku tkanek prawidłowych o częstych podziałach komórkowych (np. wytwarzający białe ciała krwi szpik kostny). [58]

Sarin i wsp. opisali wieloskładnikowy koniugat składający się z gadolinu, skompleksowanego kwasem dietylotriaminopentaoctowym (DTPA) oraz dendrymeru G5 PAMAM połączonego z doksorubicyną (DOX) do zastosowania jako teranostyk (jednocześnie lek i związek diagnostyczny) w leczeniu nowotworów mózgu. Wykazano, że ten koniugat

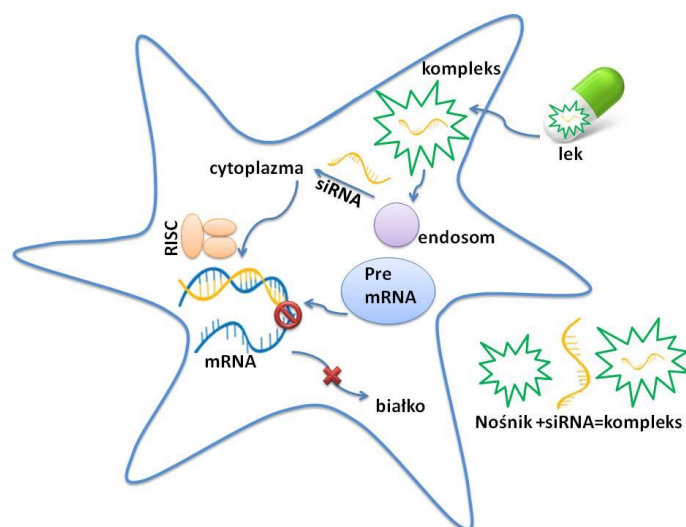
o wymiarach od 7 do 10 nm, przekracza barierę krew/mózg i może dostarczać terapeutyczne stężenia DOX do pojedynczych komórek guza mózgu. Wyniki wskazują, że w przypadku hamowania wzrostu glejaka RG-2, pojedyncza dawka koniugatu była znacząco bardziej efektywna niż sama DOX w równoważnej dawce. [59]

Mając na uwadze powyższe należy uznać, iż **peptydowe dendrymery typu „bola”** stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej wpisują się w aktualny kierunek badań nad poszukiwaniem nowych narzędzi do efektywnego dostarczania leków o działaniu przeciwnowotworowym.

Dendrymery jako nośniki materiału genetycznego

Terapia genowa polega na wprowadzeniu obcego materiału genetycznego (DNA lub RNA) do komórek, w celu uzyskania określonego efektu np. usunięcia szkodliwych dla organizmu skutków mutacji. Główne cele terapii genowej to kompensacja defektu genetycznego, korekta mutacji punktowych lub genowych, inaktywacja wybranych genów, eliminacja nieprawidłowych komórek, nadanie komórkom nowych cech fenotypowych.

Efektywne dostarczenie materiału genetycznego (lub leku) wymaga obecności nośnika, który zmniejszy identyfikację/rozpoznanie powstałego kompleksu materiał genetyczny/nośnik przez zewnątrzkomórkowy układ enzymatyczny, przetransportuje materiał genetyczny przez membranę do wnętrza komórki i finalnie uwolni w cytoplazmie w postaci dostępnej do oddziaływać (Rys. 23).[60] Kompleks powinien być membrano-aktywny, a nośnik bezpieczny i nietoksyczny. Bardzo dobrymi kandydatami do realizacji tego celu są dendrymery i dendrony, które tworząc kompleksy z kwasami nukleinowymi neutralizują ich ujemny ładunek.



Rys. 23. Proces transfekcji i wyciszania genów z użyciem nanonośnika.

Pierwszymi kationowymi cząsteczkami badanymi pod kątem terapii genowej były niskotoksyczne i biokompatybilne dendrymery polilizynowe. [22] Anionowe reszty fosforanowe kwasu nukleinowego i grupy aminowe lizyn, poprzez oddziaływania elektrostatyczne i tworzenie wiązań wodorowych, tworzą supramolekularne kompleksy (dendrypleksy), zawierające kwas nukleinowy (DNA, RNA lub antysensowne oligonukleotydy). Właściwości takiego kompleksu zależą głównie od stosunku stechiometrycznego obydwu składników (dendrymeru i materiału genetycznego), ustalonego jako proporcja azotu (N) do fosforu (P) i określanego jako tzw. N/P. [61]

Kolejnym przykładem nanonośników są amfifilowe polilizynowe dendrony drugiej generacji przedstawione w publikacji Janiszewska i wsp., które użyto do transfekcji komórek glejaka U87 i C6. Otrzymane związki wykazują dużą selektywność i są toksyczne dla komórek glejaka, ale co istotne nie uszkadzają astrocytów i neuronów dzielących anatomicznie tę samą przestrzeń w mózgu co nowotwór. [24]

W roku 2015 grupa Muñoz-Fernández zbadła możliwość wykorzystania karbosilanowego dendrymeru drugiej generacji do dostarczania materiału genetycznego do astrocytów zainfekowanych wirusem HIV-1. [62] Kationowy dendrymer kompleksowano ze specyficznym siRNA (małe interferujące RNA) wyciszającym ekspresję HIV-1 Nef, genu odpowiedzialnego za wirus HIV-1. Związek przechodził przez barierę krew-mózg i był wychwytywany przez astrocyty. Komórki astrocytów ludzkich poddane działaniu dendrypleksu wykazywały wysoką skuteczność wyciszania Nef, zmniejszając znacznie ilość cząsteczek wirusa w komórkach.

W przypadku dendrymerów typu „bola” nadal istnieje zbyt mało danych. Jedynie kilka publikacji traktuje o wykorzystaniu tych dendrymerów jako nanonośników do transportu materiału genetycznego, co zostało omówione w rozdziale 2. [46-49]

Terapia genowa jest innowacyjnym rozwiązaniem. Należy podkreślić jednak, iż do zastosowania terapii genowej w praktyce są niezbędne nośniki spełniające wysokie wymagania farmakodynamiczne. Chociaż niektóre nośniki wykazują wysoką wydajność transfekcji, dużym problemem pozostaje znaczna toksyczność po ich systemowym podaniu do organizmu. Ten powód oraz inne wady, takie jak niepożądane efekty uboczne, niska biodostępność czy degradacja enzymatyczna nośnika sprawiają, że wiele potencjalnych związków nie zostaje dopuszczonych do zaawansowanych badań klinicznych. Dlatego tak ważne jest opracowanie inteligentnych, mniej toksycznych cząsteczek.

Dendrymery, a w szczególności dendrymery typu „bola” stanowią potencjalnie doskonały przykład nanonośników do dostarczania do komórek docelowych leków czy materiału genetycznego i mogą być starannie zaprojektowane poprzez skumulowanie w jednej strukturze korzystnych fragmentów. Pozwala to na stosowanie mniejszych dawek leków, z mniejszymi efektami ubocznymi.

4. Dendrymery i choroby układu nerwowego

Układ nerwowy jest niezwykle złożonym i skomplikowanym systemem, który reguluje i koordynuje czynności organizmu. Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) kontroluje większość funkcji ciała i umysłu, składa się on z mózgu i rdzenia kręgowego. Wiele narządów i tkanek w organizmie może powrócić do prawidłowego stanu po urazie bądź chorobie, jednak w przypadku komórek ośrodkowego układu nerwowego, które są wysoce wyspecjalizowane oraz nie mogą się dzielić i tworzyć nowych komórek powrót do zdrowia staje się znacznie trudniejszy. Choroby układu nerwowego spowodowane np. infekcjami, urazami, nowotorem lub neurodegeneracją stanowią znaczne obciążenie społeczne, a pomimo wielu badań i odkryć w tym zakresie nadal brakuje skutecznych terapii. Co więcej, w większości przypadków, obecne metody leczenia są po prostu niewystarczające, aby wpłynąć na postęp choroby czy też złagodzić objawy i oznaki uszkodzenia lub degeneracji mózgu. [63,64]

Zaburzenia układu nerwowego mogą obejmować: zaburzenia naczyniowe (udar mózgu, krwotok podpajęczynówkowy, krwotok podtwardówkowy), zakażenia (zapalenie opon mózgowych, zapalenie mózgu, polio) guzy mózgu lub rdzenia kręgowego, neuropatię obwodową i zaburzenia czynnościowe (epilepsja i nerwobóle) czy też choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne (ALS), płasawica Huntingtona i choroba Alzheimerera).

Głównym wyzwaniem podczas leczenia chorób OUN jest transport środków terapeutycznych lub obrazowych środków kontrastowych do układu nerwowego i zachowanie zdolności do ukierunkowanego dostarczania ich do odpowiednich podregionów mózgu lub rdzenia kręgowego. Jest to niezwykle trudne, ponieważ od momentu podania środka terapeutycznego/diagnostycznego do momentu dotarcia do docelowej, uszkodzonej komórki OUN, związek musi pokonać kilka barier. Jedną z tych barier stanowi szeroko badana bariera krew-mózg (ang. blood-brain barrier, w skrócie BBB).[65] Zdolność cząsteczki do przekraczania BBB i wnikania do mózgu zależy od jej wielkości, ładunku i hydrofilowości. Z reguły wysoce lipofilowe cząsteczki o małej masie cząsteczkowej mogą biernie dyfundować przez komórki śródbłonna naczyń włosowatych mózgu, z kolei większość cząsteczek hydrofilowych o dużej masie cząsteczkowej nie może biernie przekraczać BBB.[66]

W dziedzinie neuromedycyny opracowano różne strategie mające na celu zwiększenie zdolności związków do przekraczania BBB i wnikania do OUN np. po podaniu dożylnym,

jednak nadal brakuje zaawansowanych badań klinicznych. Ponadto, niezwykle złożony problem stanowi synteza odpowiednich związków i kompleksów do zastosowania w leczeniu zaburzeń związanych z OUN, które powinny być otrzymane zgodnie z zasadami dobrej praktyki wytwarzania (GMP) i przebadane w następujących po sobie fazach badań klinicznych. [67, 68]

Wśród dendrymerów stanowiących nanonośniki do zastosowań w terapii centralnego układu nerwowego najczęściej badanymi dendrymerami są PAMAM [69, 70], PPI [71], PLL [72,73], karbosilanowe [74] oraz fosforowe [75].

Nowotwory centralnego układu nerwowego, a w szczególności nowotwory mózgu obejmują grupę różnorodnych schorzeń. Specyficzna anatomia i fizjologia mózgu powoduje, iż guzy mózgu, często różnią się od siebie przyczynami powstawania, objawami czy przebiegiem oraz są niezwykle trudne do leczenia. [76] Glejaki są jednymi z najbardziej agresywnych i najmniej uleczalnych nowotworów złośliwych u ludzi, ze względu na nieprzewidywalną proliferację i dużą inwazyjność. Ponieważ skuteczność konwencjonalnych chemioterapii glejaka (np. chemioterapii opartej na temozolomidzie i karmustynie w połączeniu z chirurgią i radioterapią) jest ograniczona, zaproponowano różne rodzaje związków chemicznych jako alternatywne metody leczenia.

Ostatnio ważne badania dotyczące zastosowania naturalnych, kationowych peptydów w leczeniu glejaka zostały przeprowadzone w grupie Riedl i wsp., Autorzy początkowo odkryli, że w membranach komórek nowotworowych występuje wyjątkowo duża zawartość anionowego fosfolipidu fosfatydyloseryny, co może być celem molekularnym podczas procesu rozpoznania/leczenia. Następnie za pomocą analogów ludzkiej laktoferycyny selektywnie celowali w ujemnie naładowane cząsteczki fosfatydyloseryny znajdujące się na zewnątrz błony komórkowej czerniaka, glejaka i mięśniakomięsaka prądkowanokomórkowego, a także komórek raka prostaty i nerki [77, 78]. W następstwie tych odkryć, zbadano skuteczność kilku strukturalnie różnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP, ang. antimicrobial peptides) pojedynczo [79,80,81] lub jako materiałów hybrydowych [82,83,84,85,86] wobec komórek glejaka i wykazano ich znaczącą aktywność wraz z zależną od struktury wszechstronnością mechanizmu działania [87,88,89].

Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia dotyczące AMP oraz właściwości dendrymerów tj. możliwość wprowadzenia wielu ligandów i ładunków dodatnich wewnątrz dendrymeru, najbardziej interesujące z punktu widzenia syntetycznego i aplikacyjnego

są kationowe AMP z wieloma kopiami określonych aminokwasów. W ostatnich latach potwierdzono właściwości przeciwnowotworowe dwóch serii naturalnych peptydów bogatych w histydynę: wyizolowanych z ludzkiej śliny histatyn [90,91,92] oraz peptydu Tilapia piscidin 4 (TP4), który poza właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi [93] i właściwościami przeciwnowotworowymi [94,95] wykazuje również aktywność wobec komórek glejaka. Wspomniane peptydy, podobnie jak ludzki peptyd RL-37, posiadają 3-4 kopie histydyny zlokalizowane na N-końcu. Przyjmują one konformację przypadkową w roztworach hydrofilowych i konformację α -helikalną w roztworach organicznych. Drugą grupę stanowią AMP bogate w prolinę, takie jak peptyd PR39, który hamuje migrację i inwazję komórek raka piersi [96] oraz peptydy obronne (ang. defense peptides) należące do grupy katelicydyn, które posiadają wiele prolin wewnątrz sekwencji liniowej. Wśród nich gonkocyna, apidaecyna i droscyna [97], które są głównie doskonałymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, mogą także przekraczać barierę krew-mózg i selektywnie docierać do struktur mózgowych [98,99].

Warto zauważyć, iż liniowe peptydy są na ogół niestabilne w fizjologicznym pH, charakteryzują się małą biodostępnością oraz łatwo ulegają proteolizie.[100] Dlatego wbudowanie ich w strukturę dendrymeru wpływa korzystnie na zwiększenie stabilności oraz pozwala osiągnąć korzystny efekt addytywności pożądanych właściwości np. przeciwnowotworowych wykazywanych przez peptydy bogate w histydynę lub prolinę.

Nowe strategie w zakresie nanomedycyny oraz wykorzystanie nanonośników w tym peptydowych dendrymerów zawierających związki o potwierdzonych właściwościach przeciwnowotworowych lub przeciwdgeneracyjnych mogą przyczynić się do rozwiązania wspomnianych problemów związanych z leczeniem zaburzeń OUN i zapewnić nowe, skuteczne terapie.

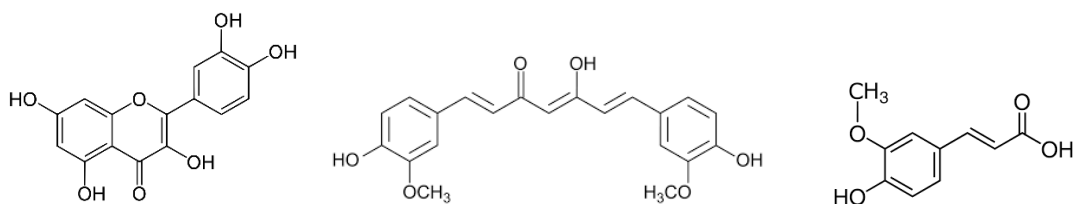
5. Związki o właściwościach antyoksydacyjnych, w tym koniugaty dendrymer – antyoksydant oraz ich rola w procesie nowotworzenia i leczenia nowotworów

Procesy redukcji i utleniania (w skrócie redox) leżą u podstaw wielu procesów przemiany materii w żywej komórce umożliwiając jej prawidłowe funkcjonowanie. Polegają one na zmianie wartościowości cząsteczki lub atomu poprzez przeniesienie elektronu/ów. W ten sposób na przykład pozyskiwana jest energia potrzebna do zapewnienia odpowiedniej temperatury czy do przebiegu reakcji chemicznych w komórce. Procesy te są kontrolowane przez różne układy enzymatyczne, niektóre makrocząsteczki, a także małe cząsteczki organiczne, których rolą jest anihilacja nadmiaru wolnych rodników. Jednakże na skutek deregulacji tych procesów lub nadmiernej ekspozycji na czynniki zewnętrzne (np. promieniowanie słoneczne czy obecność wolnych rodników) ilość produktów oksydacji, w szczególności reaktywnych form azotu i tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) - cząsteczek tlenu posiadających jeden niesparowany elektron, może powodować w komórce procesy patologiczne. Wysoki poziom ROS w komórce, zwany także „stresem oksydacyjnym” powoduje znaczące zmiany struktur biologicznie ważnych cząsteczek, uszkadza jądrowe i mitochondrialne DNA oraz wzmacnia apoptozę (programowaną śmierć komórki) prowadząc np. do występowania chorób typowych dla społeczeństw wysokorozwiniętych. Obecnie uważa się, że niekontrolowane procesy utleniania mogą być początkiem wielu procesów chorobowych, w tym procesu nowotworzenia [101,102,103] czy starzenia się komórek. [104,105]

Uważa się, że ten drugi aspekt może mieć szczególne znaczenie w powstawaniu ale także leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, współcześnie coraz częściej występujących w starzejących się społeczeństwach. Należy pamiętać, iż komórki układu nerwowego do prawidłowego funkcjonowania potrzebują dużej zawartości tlenu oraz że nie mają dobrze wykształconych mechanizmów antyoksydacyjnych. Ponadto mają w strukturze membran komórkowych wyjątkowo czułe na stres oksydacyjny fosfolipidy zawierające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych. [106,107]

Dlatego, mając na uwadze powyższe stwierdzenia, występujące w owocach i warzywach naturalne związki o własnościach neutralizacji/wygaszania wolnych rodników budzą obecnie duże nadzieje jako środki do zapobiegania i leczenia nowotworów [108]. Wśród nich najlepiej zbadaną grupą są naturalne polifenole takie jak kwasy fenolowe, flawonoidy, flawony, kwercetyna czy karotenoidy, w tym α - i β -karoten, β -kryptoksantyna, luteina. Jednakże pomimo ogromnego zaangażowania wielu laboratoriów i bardzo licznych przykładów

pozytywnego działania antyoksydantów na homeostazę komórki ilość badań *in vivo* jest nadal ograniczona. [109]



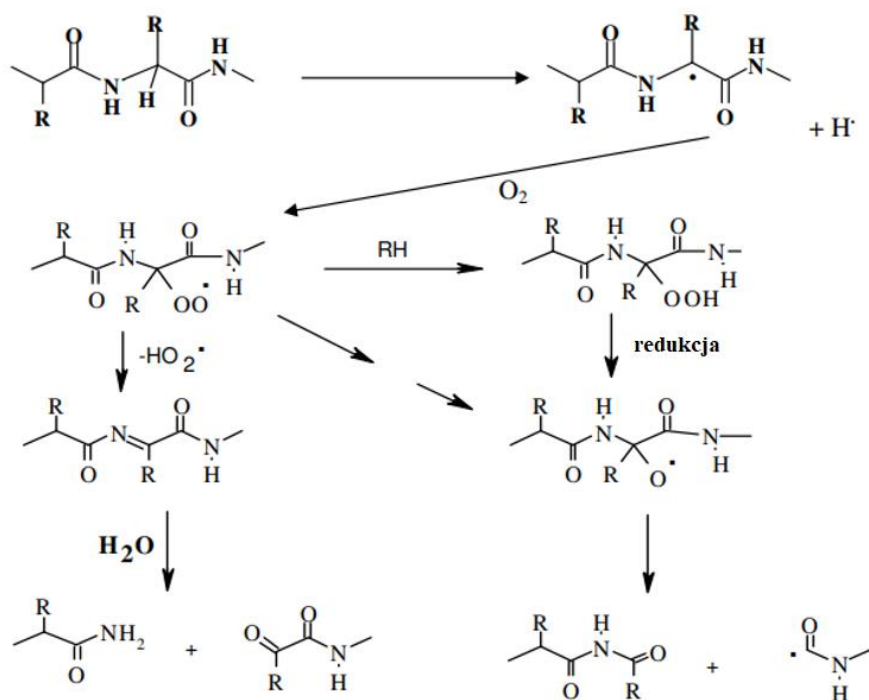
Rys. 24 . Przedstawiciele naturalnych polifenoli – kwercetyna, kurkumina oraz kwas ferulowy

Związane jest to głównie z nietrwałością chemiczną (antyoksydanty wykazują wysoką wrażliwość na światło i temperaturę) lub skomplikowaną i kosztowną procedurą izolacji wspomnianych związków ze źródeł naturalnych. Dlatego też aby zwiększyć ich trwałość chemiczną lub biodostępność proponuje się zastosowanie nanocząsteczkowych nośników, do których cząsteczki związków naturalnych dołączone są kowalencyjnie lub niekowalencyjnie. Takie rozwiązanie dotyczy w szczególności podawania polifenoli jako leków w chorobach neurodegeneracyjnych. [110, 111]

Jedną z grup związków, które mają duży potencjał jako nośniki ugrupowań o własnościach przeciwutleniających są dendrymery. W ciągu ostatnich pięciu lat opublikowano kilka prac na temat zastosowania dendrymerów jako nośników reszt o aktywności antyutleniającej. Mencina i wsp. wykorzystali dendrymery karbosilanowe, jako nośniki reszt polifenoli naturalnych i wykazali aktywność antyproliferacyjną wobec nowotworu prostaty [112]. Kannan i wsp. wykorzystali dendrymery zawierające układ benzoheterazolu i jednostkę triazolu, jako związki o inherentnej aktywności antyoksydantnej [113]. W naszym zespole powstała praca o peptydowych dendrymerach funkcjonalizowanych resztami kwasu p-aminobenzoowego (PABA), które mogą stanowić potencjalne źródło nowych antyoksydantów zmiatających kationowe i obojętne rodniki. Wspomniane peptydowe dendrymery funkcjonalizowane PABA są ponadto selektywne wobec komórek czerniaka lub neuronów CGC poddanych stresowi glutaminianowemu [114].

Nowotwory mózgu i choroby neurodegeneracyjne stanowią główne schorzenia ośrodkowego układu nerwowego i budzą niepokój wśród społeczeństw oraz zainteresowanie grup badawczych. Patogeneza obu rodzajów zaburzeń została powiązana ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego, który prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych i zmian strukturalnych w białkach. W wyniku uszkodzeń, białka tracą swoje właściwości biologiczne i dochodzi do ich dezaktywacji, co w konsekwencji prowadzi do akumulacji wadliwych białek i tworzenia form patologicznych. Schemat przemian zaprezentowany na Rys. 25 jest następujący:

1) w wyniku reakcji z rodnikiem dochodzi do oderwania atomu H przy atomie węgla alfa w łańcuchu białkowym; 2) powstały rodnik reaguje z tlenem tworząc rodnik nadtlenkowy; 3) w kolejnym etapie następuje reakcja eliminacji z uwolnieniem HO_2^\bullet prowadząca do powstawania iminy i dalsza reakcja hydrolizy prowadząca do fragmentacji łańcucha białkowego albo 3a) może nastąpić reakcja konkurencyjna polegająca na oderwaniu atomu H z innego związku, co umożliwi powstanie wodoronadtlenku, a dalszy przebieg reakcji jest związany z rozkładem wodoronadtlenków na rodniki oraz fragmentacją łańcucha białkowego poprzez rodnik alkoksylowy. [115,116]



Rys. 25. Sposób działania wolnych rodników na białka prowadzący do ich destabilizacji i fragmentacji. [117]

Uwzględniając postulowany pogląd o wspólnej patogenezie, podczas realizacji prac badawczych zainteresował mnie aspekt oddziaływań amfifilowych, polifunkcyjnych rozgałęzionych peptydów sfunkcjonalizowanych małymi cząsteczkami o aktywności antyoksydacyjnej na zwijanie i dekonstrukcję struktur drugorzędowych białek. Problem ten jest istotny w powstawaniu i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak np. choroby Alzheimera czy Parkinsona. Badania takie zapoczątkowała grupa prof. B. Klajnert z Uniwersytetu Łódzkiego i objęły one początkowo oddziaływania wysokich generacji polikationowych dendrymerów typu PAMAM, otrzymywanych w grupie Tomalii, na fibryle peptydów amyloidowych [118,119], a następnie dendrymery fosforowe otrzymywane w grupie prof. Majoral'a w Tuluzie [120].

Inne grupy badały pod tym względem dendrymery polisacharydowe, których zaletą w porównaniu do polikationowych dendrymerów PAMAM jest brak toksyczności komórkowej [121].

W moich badaniach skupiłem się na mniejszych rozgałęzionych dendronach, badając je pod kątem mechanizmu oddziaływania z drugorzędowymi strukturami tworzonymi przez dwa polipeptydy poli-L-lizynę i kwas poli-L-glutaminowy, które służą jako model agregacji białek i fibrylogenezy. Tworzenie nierozpuszczalnych agregatów stanowi cechę charakterystyczną dla wielu chorób neurodegeneracyjnych. Szczegółowe zbadanie oraz zrozumienie procesu agregacji umożliwi zaprojektowanie nowych jednostek molekularnych, a jedną z możliwych dróg do osiągnięcia lepszych i bardziej zaawansowanych terapii jest zastosowanie peptydowych dendronów lub dendrymerów w połączeniu z naturalnymi polifenolami.

Dendrony lub dendrymery funkcjonalizowane antyoksydantami mogą więc łączyć w sobie wiele korzystnych cech i właściwości. Takie koniugaty stają się swego rodzaju złożonymi antyoksydantami o aktywności przeciwnowotworowej i neuroprotekcijnej, a ponadto mogą wykazywać działanie antyagregacyjne poprzez destabilizację struktur drugorzędowych białek. Należy podkreślić, że peptydowe dendrymery, a w szczególności peptydowe dendrony będące przedmiotem niniejszej dysertacji nie były jak dotąd badane pod kątem oddziaływania lub dekonstrukcji struktur drugorzędowych białek, a wyniki doświadczalne mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój chorób neurodegeneracyjnych. Szczegółowe dane oraz wyniki dotyczące powyżej opisanego aspektu zostały przedstawione w części eksperymentalnej niniejszej dysertacji, a ponadto wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w 2020 roku. [122]

Ponieważ większość otrzymanych przeze mnie dendrymerów „bola” zawierała reszty imidazolu o znanej aktywności przeciwutleniającej (np. His) oraz nieoczywistą pod kątem aktywności redoks prolinę (Pro), druga grupa zagadnień obejmowała badania właściwości redukujących oraz możliwości wyłapywania generowanych w roztworze neutralnych i kationowych form rodnikowych. Szczegółowe dane oraz wyniki dotyczące powyżej opisanego aspektu zostały przedstawione w części eksperymentalnej niniejszej dysertacji oraz stanowią zgłoszenie patentowe pt. „Nanocząsteczkowe, peptydowe dendrymery, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowania” o numerze P.435269 złożone w Urzędzie Patentowym RP 12.09.2020 r.

Obecnie, badania nad aktywnością antyoksydacyjną związków przeprowadza się wykonując miarodajne dwa typy testów. Badając aktywność redukującą wykonuje się test

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) i CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity), z kolei do zbadania zdolności zmiatania wolnych rodników tlenowych służy test DPPH (Total free radical scavenging assay) i ABTS (Radical scavenging assay) [123,124].

Pokrótcie, poniżej opisano wymienione testy przeprowadzone w Instytucie Chemii Organicznej PAN, którym poddano wybrane związki.

Metoda FRAP wyznacza zdolność redukowania jonów żelaza Fe^{3+} . Zasada działania tej metody opiera się na pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-S-tiazyny) pod wpływem działania antyoksydantu. Z bezbarwnego odczynnika powstaje intensywnie niebieski produkt z maksimum absorpcji przy długości fali 593-595 nm.

Metoda CUPRAC jest stosowana do oznaczania zdolności do redukowania jonów Cu(II). Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji powstającego barwnego kompleksu jonów Cu(I) z batokuproiną (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina) lub neokuproiną (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina).

Metoda ABTS – stosowany tutaj odczynnik ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] umożliwia pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej związków. Antyoksydanty powodują redukcję kationorodnika w stopniu zależnym od czasu trwania reakcji, stężenia przeciwutleniacza oraz jego aktywności. Następuje zanik barwy roztworu proporcjonalny do zawartości przeciwutleniaczy w roztworze.

Metoda DPPH stosowana jest w celu określenia potencjału antyoksydacyjnego związków. W tej metodzie wykorzystuje się stabilny rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy (DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical), który w roztworze alkoholu ma barwę purpurową. W trakcie testu DPPH wychwytuje elektrony od antyoksydanta i przechodzi do słabo zabarwionego produktu powodując zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej na żółtą. Zmianę tę monitoruje się spektrofotometrycznie.

II. HIPOTEZA NAUKOWA, CEL I ZAKRES PRACY

Wprowadzenie. Choroby układu nerwowego (nowotwory, choroby neurodegeneracyjne) są obecnie drugą przyczyną zgonów w krajach rozwijających się. W ciągu ostatnich trzech dekad liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce wzrosła ponad dwukrotnie. Podobnie choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, itp., są coraz większym wyzwaniem dla systemów ochrony zdrowia w starzejących się społeczeństwach krajów rozwiniętych. Poszukiwanie skutecznych substancji terapeutycznych nowych generacji stanowi nadal ważny aspekt chemii medycznej. Równolegle poszukuje się nowych sposobów polepszenia własności farmakodynamicznych już stosowanych leków np., poprzez bezpośrednie ich dostarczenie do komórek chorobowo zmienionych bez naruszania komórek zdrowych (tzw. terapie celowane), między innymi, za pomocą substancji nośnikowych. W tym zakresie, duże możliwości oferuje obecnie nanomedycyna. Coraz częściej wykorzystywane są do tego celu nanocząsteczki, takie jak polimery czy dendrymery, kropki kwantowe pozwalające łączyć w jednej cząsteczce kilka funkcji np. terapeutyczną i diagnostyczną. Wśród tych nanocząstek dendrymery ze względu na wysoką monodispersyjność, dobrze zdefiniowane metody syntezy i praktycznie nieograniczone możliwości budowania skomplikowanych wielofunkcyjnych struktur cieszą się dużym zainteresowaniem.

Badania literaturowe przedstawione we wstępie pozwoliły na postawienie hipotezy, że dimeryczne dendrymery o strukturze „bola” mogą mieć kilka cech cennych dla zastosowań biomedycznych. Przede wszystkim, osiągnięcie wysokiej masy cząsteczkowej i dużych wymiarów cząsteczek (koniecznych dla dłuższej cyrkulacji cząsteczek w organizmie) poprzez syntezę rozgałęzionych dendronów niższych generacji i ich dimeryzację za pomocą liniowych łączników jest chemicznie lepiej kontrolowane niż synteza i oczyszczanie dendrymerów wyższych generacji. W planowanych amfifilowych strukturach typu „bola” dodatni ładunek cząsteczki jest rozłożony po dwóch stronach co może skutkować mniejszą toksycznością w komórce. Mając na uwadze potencjalne zastosowanie tych związków jako nośników cząsteczek leków onkologicznych lub siRNA, struktura „bola” zapewnia zarówno oddziaływania hydrofilowe z dendronowymi głowami jak i hydrofobowe z alifatycznym łącznikiem. I w końcu taka struktura daje możliwość umieszczenia w strukturze grup funkcyjnych umożliwiających biodegradację cząsteczek w komórce (estrowa, disiarczkowa).

W związku z powyższą hipotezą, celem przedstawionej pracy doktorskiej jest zaprojektowanie i opracowanie metodyki syntezy nanocząsteczkowych peptydowych dendronów i dendrymerów o strukturze „bola” oraz zbadanie ich właściwości fizykochemicznych i oddziaływania ze zdrowymi i chorobowo zmienionymi komórkami układu nerwowego.

Metodyka badań obejmuje optymalizację sposobu otrzymywania cząsteczek o strukturze „bola”, metodami w roztworze i na żywicy, dobranie sposobu ich oczyszczania i metod charakteryzowania. Planowane jest otrzymanie struktur trwałych chemicznie jak też takich, które są degradowane na mniejsze fragmenty na skutek specyficznych warunków istniejących w komórce, np. niższego pH (charakterystyczne dla komórek nowotworowych) lub na skutek obecności naturalnych substancji zapewniających homeostazę redox (glutation). Istotny będzie także dobór aminokwasów lub innych cząsteczek użytych do funkcjonalizacji.

Celem biologicznym wyznaczonym dla tych nanozwiązków są choroby układu nerwowego. Badania planowane są w dwóch kierunkach – zbadanie ich inherentnej cytotoxyczności wobec linii komórkowych glejaka w porównaniu do komórek zdrowych neuronów, a także zbadanie ich potencjału jako substancji nośnikowych. Badania cytotoxyczności przeprowadzone będą we współpracy z grupą prof. Jarosława Czyży z Katedry Biologii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Obecnie uważa się że zarówno nowotwory komórek nerwowych jak też chorób neurodegeneracyjnych wynikają między innymi z zaburzenia w kontroli komórkowych procesów utleniania/redukcji. Dlatego zbadane będą ich własności redukujące (testy FRAP i CUPRAC) oraz zdolność do wygaszania wolnych rodników tlenowych (testy ABTS i DPPH). Innym powodem powstawania chorób neurodegeneracyjnych jest nieprawidłowa samoagregacja cząsteczek peptydów lub białek prowadząca do tworzenia uszkodzających neurony nierozpuszczalnych form bogatych w struktury β . Dlatego dla wybranych dendronów zbadane będą ich oddziaływania ze strukturami drugorzędowymi tworzonymi przez modelowe polipeptydy.

Drugi aspekt obejmuje sprawdzenie ich zdolności do tworzenia supramolekularnych kompleksów ze znanymi lekami przeciwnowotworowymi i wykonany będzie metodami HPLC. Wśród wybranych leków onkologicznych, na szczególną uwagę zasługuje stosowany w leczeniu glejaków temozolomid.

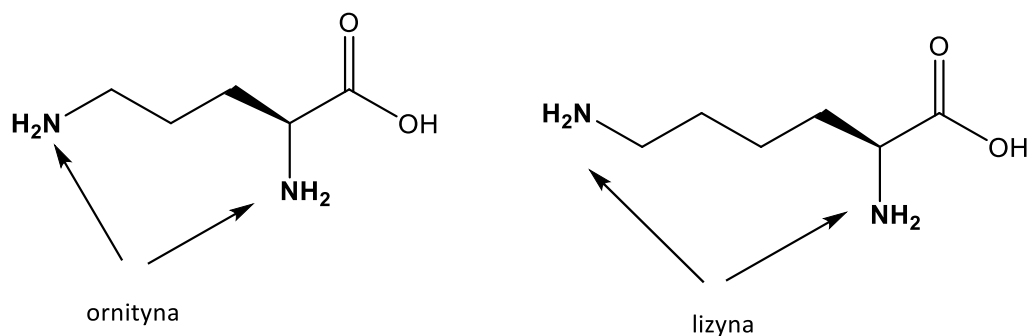
III. BADANIA WŁASNE

1. Strategia syntezy zasadowych dendrymerów peptydowych

Synteza dendrymerów o jednoznacznie zdefiniowanej strukturze przestrzennej jest skomplikowana i wymaga dużej ilości czasu oraz pracy. Oczyszczanie dendrymerów stanowi bardzo istotny element, a zarazem jest to zadanie niezwykle żmudne i często nie udaje się w pełni oczyścić dendrymerów ze względu na ich skomplikowaną budowę czy właściwości.

Problemem, o którym należy pamiętać i który może wystąpić podczas syntezy, jest obecność zawady sterycznej oraz tendencja dendrymeru do zawijania się do wnętrza tzw. *backfolding*. Przestrzenna dostępność grup funkcyjnych ma ogromne znaczenie na każdym etapie dendrymeryzacji i stanowi istotny problem podczas syntezy, ponieważ ogranicza dostęp do grup funkcyjnych, skutkując niepełnym stopniem obsadzenia cząsteczki. Tak więc istotne jest opracowanie optymalnych warunków reakcji (odpowiednia temperatura, pH, czas reakcji) oraz procesu oczyszczania (stosowanie chromatografii sączenia molekularnego SEC i preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej).

Tworzenie dendrymeru peptydowego rozpoczyna się od wybrania odpowiedniego elementu rozgałęziającego, który będzie powodował rozgałęzianie narastającego łańcucha peptydowego. Spośród naturalnych aminokwasów rolę czynnika rozgałęziającego może spełniać L-lizyna, L-ornityna lub L-arginina. Podczas pracy wykorzystałem lizynę i ornitynę do konstrukcji zasadowych rdzeni dendronów i dendrymerów. Różnica w budowie tych aminokwasów (obecność lub brak dodatkowej grupy $-CH_2$) okazała się istotna podczas otrzymywania dendrymerów, a także umożliwiła porównanie strategii syntetycznych i opracowanie odpowiednich warunków syntezy.



Rys. 26. Aminokwasy zasadowe stanowiące element rozgałęziający w trakcie syntezy dendrymerów.

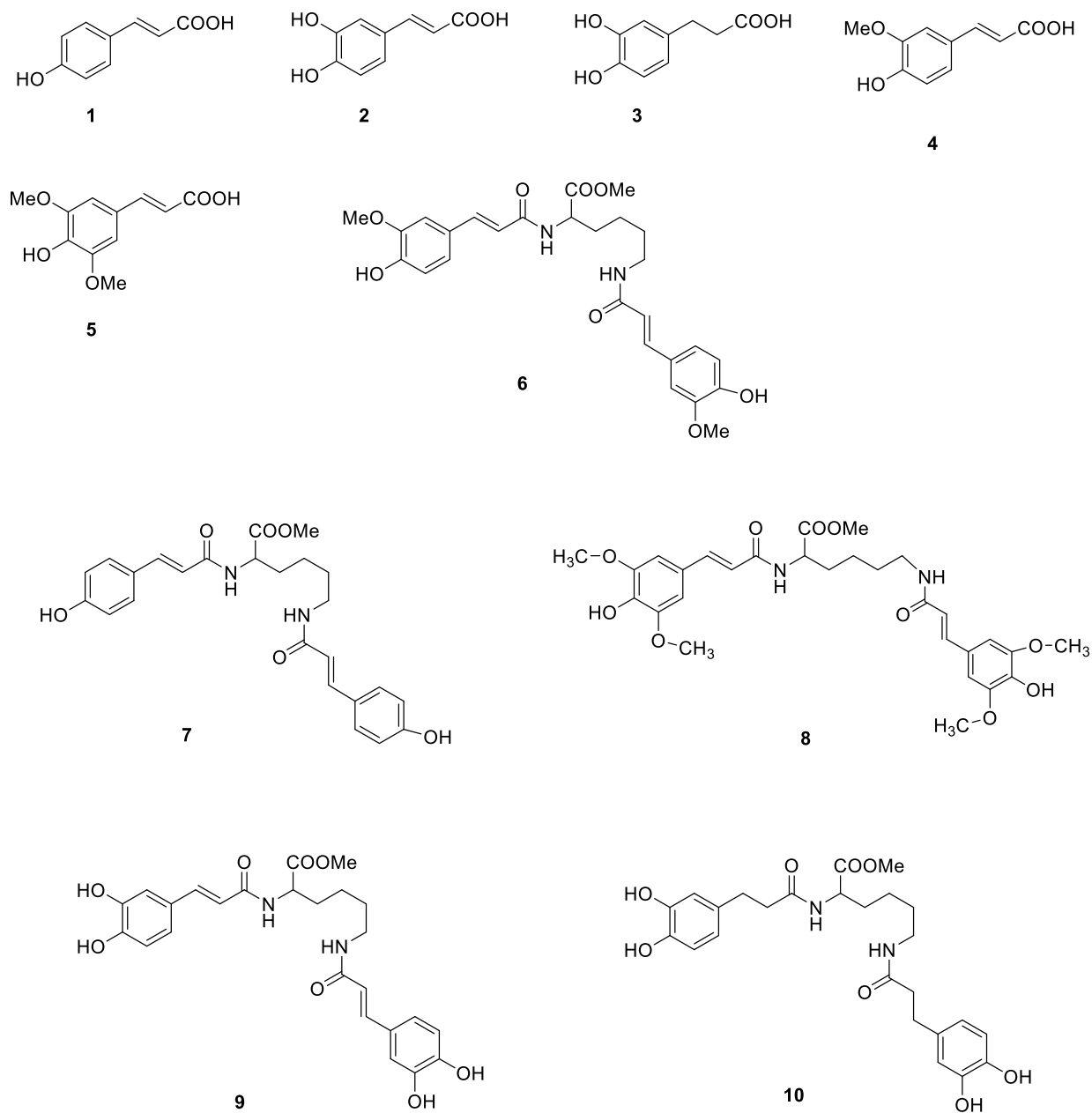
Reakcję sprzęgania aminokwasów prowadziłem zarówno metodą na nośniku stałym według metodologii Fmoc, a także stosując metodę aktywnych estrów prowadząc syntezy w roztworze według metodologii Boc. Obie te metody oraz ich kombinacje są wykorzystywane w chemii peptydów.

Podczas planowania syntez niezwykle ważny jest dobór odpowiednich warunków sprzęgania monomerów (aminokwasów), tak by finalnie uzyskać pożądaną dendrymer o wysokim stopniu czystości i dobrej wydajności. Do prowadzenia syntezy w roztworze najlepszym odczynnikiem sprzęgającym okazał się *N,N'*-Dicykloheksylokarbodiimid (DCC) z zastosowaniem *N*-hydroksysukcynoimidu (HOSu) eliminującego procesy racemizacji. Jako rozpuszczalnik stosowałem THF. Z kolei prowadząc syntezę na nośniku stałym stosowałem jako odczynnik sprzęgający heksafluorofosforan 1- [bis(dimetyloamino)metyleno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pirydyniowy (HATU) lub *N,N'*-diizopropylkarbodiimid (DIC), zasadę *N,N*-diizopropyletyloaminę (DIPEA), a jako rozpuszczalnik DMF.

Podczas syntezy dendronów i dendrymerów posiadających grupy aminowe istotne jest dobranie odpowiednich, ortogonalnych grup ochronnych. Wybór takiej grupy jest uzależniony od warunków prowadzenia reakcji, innych ugrupowań występujących w cząsteczce, jak również od zakładanego finalnego wzoru związku docelowego. W niniejszej pracy stosowane są dwie grupy ochronne: grupa *tert*-butoksykarbonylowa (Boc) oraz 9-fluorenylometoksykarbonylowa (Fmoc).

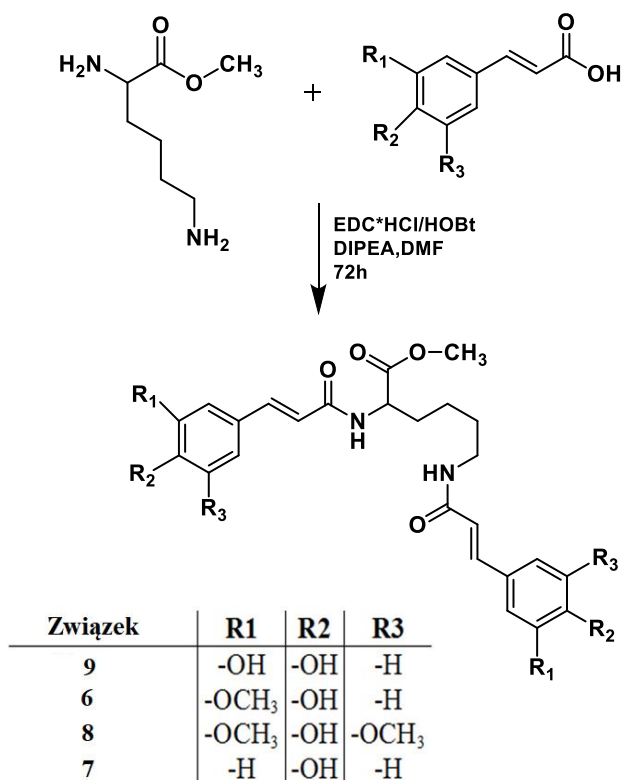
1.1 Synteza małych dimerów zawierających pochodne kwasu cynamonowego

Naturalne polifenole to grupa związków o bardzo zróżnicowanej budowie i właściwościach. Ich antyoksydacyjne zdolności wynikają z obecności grup –OH przyłączonych do pierścienia aromatycznego. Szczególną uwagę zwracają pochodne kwasu cynamonowego o dobrze udokumentowanych właściwościach przeciwutleniających. W pierwszym etapie pracy przystąpiłem do syntezy małych dimerów składających się z lizyny i pochodnych kwasu cynamonowego w celu zbadania i ustalenia, który z otrzymanych związków będzie wykazywał najlepsze właściwości antyoksydacyjne. Ostatecznie udało się stworzyć i przebadać bibliotekę małych związków, a w wyniku przeprowadzonych badań okazało się, iż najlepsze właściwości antyoksydacyjne posiada kwas synapinowy. Takie postępowanie miało ułatwić projektowanie kolejnych, bardziej rozgałęzionych cząsteczek.



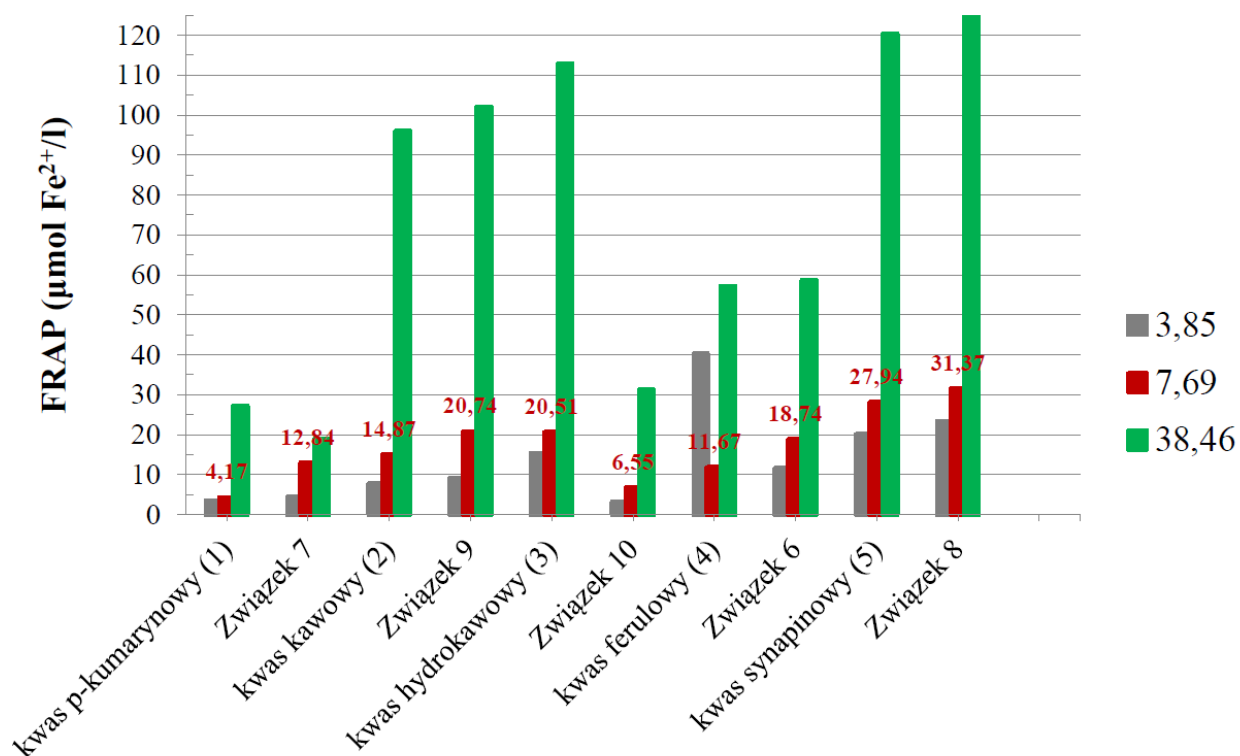
Rys. 27. Biblioteka małych związków o właściwościach antyoksydacyjnych.

Związki **6-10** otrzymano stosując klasyczną metodę syntezy peptydów w roztworze, co przedstawiono na schemacie 1.

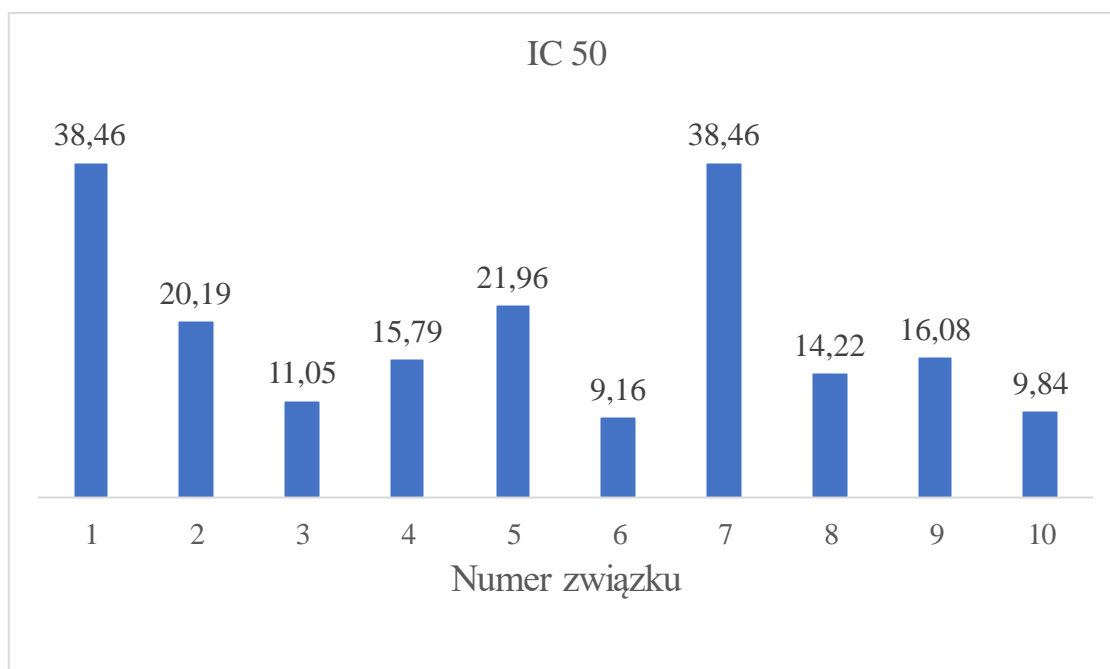


Schemat 1. Synteza małych dimerów zawierających pochodne kwasu cynamonowego.

Dla związków **1-10** przeprowadzono badania FRAP i ABTS celem oszacowania ich właściwości antyoksydacyjnych, a także ustalono dla tych związków IC₅₀.



Rys. 28. Wykres przedstawiający wyniki uzyskane dla związków **1-10** podczas badań FRAP.



Rys. 29. Wartości IC₅₀ dla związków **1-10**.

W kolejnym etapie przechodząc do syntezy peptydowych dendronów metodą na żywicy, które miały posiadać na swoim obrzeżu pochodną kwasu cyjanonowego wybrałem kwas synapinowy o potwierdzonych wcześniej bardzo dobrych właściwościach przeciwtleniających.

1.2 Synteza dendronów lizynowych na nośniku stałym

Syntezę peptydowych dendronów przeprowadziłem z wykorzystaniem metody Merrifielda na stałym nośniku polimerowym. Grupy α -aminowe lizyny chroniłem osłoną 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc). Żywice, które stosowałem w trakcie pracy wraz z warunkami odszczepiania związków od nośnika przedstawia Tabela 2 (2CL, Wang, Tenta Gel).

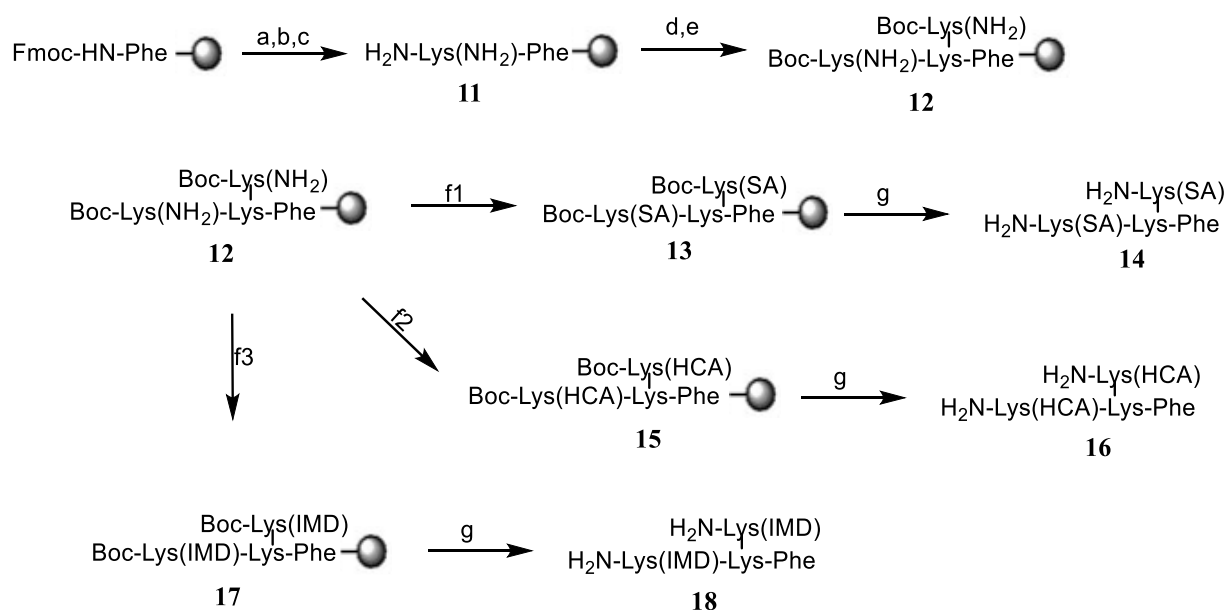
Tabela 1. Żywice stosowane w trakcie pracy wraz z warunkami odszczepiania związków od nośnika

Żywica	Stopień osadzenia	Warunki odszczepiania
2CL	0,82 mmol/g	TFA:DCM (5 : 5) + TIS lub fenol, temp. pok., 2- 4 godz.
Wang,	1,1 mmol/g	TFA:H ₂ O (9,5 : 0,5), temp. pok., 2- 4 godz.
Tenta Gel S PHB	0,25 mmol/g	TFA:H ₂ O (9: 1) + TIS lub fenol, temp. pok., 4 godz.

Do zaplanowanych syntez dendronów modyfikowanych kwasem synapinowym lub pochodnymi imidazolowymi najlepsza okazała się żywica 2-chlorotrytylowa umożliwiająca otrzymanie zaprojektowanych związków.

Peptydy odszczepiałem od nośnika roztworem kwasu trifluoroctowego (TFA) z dodatkiem triizopropylsilanu (TIS) lub fenolu. Po odsączeniu od ziaren nośnika i odparowaniu przesącza, surowe związki wytrącałem schłodzonym eterem dietylowym, sączyłem, a uzyskane osady suszyłem w eksykatorze lub liofilizatorze. Ogólny schemat syntezy peptydów na nośniku stałym został przedstawiony na Rys. 8.

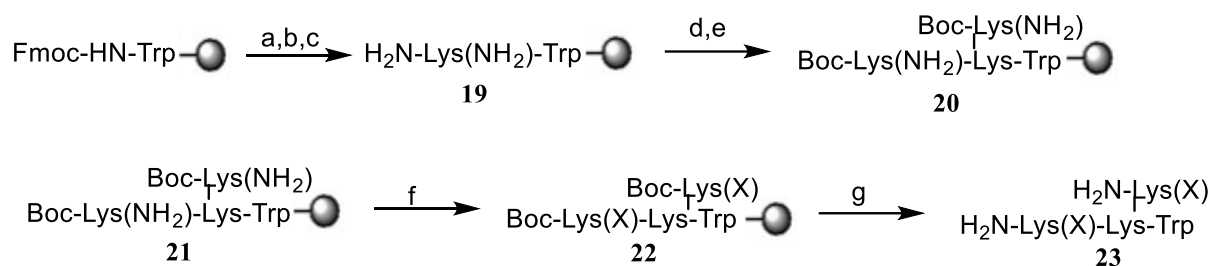
Związki oczyszczałem metodą sączenia molekularnego stosując złożę Sephadex LH-20 i/lub metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) w układzie gradientowym rozpuszczalników woda – metanol z dodatkiem HCl. Otrzymane związki zostały scharakteryzowane za pomocą HPLC firmy Knauer z kolumną Jupiter C18 przy długości fali $\lambda = 216$ nm i $\lambda = 280$ nm oraz metodą spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR.



Schemat 2. Synteza dendronów **14**, **16** oraz **18** na żywicy 2-chlorotrytylowej. Reagenty i warunki: (a) 20% piperodyna, 2x5 min w temp. pok.; (b) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (c) 20% piperodyna, 2x10 min w temp. pok.; (d) Boc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (e) 20% piperodyna, 2x10 w temp. pok.; (f1) kwas synapinowy (SA), DIC, Oxyma pure, DIPEA, 4h w temp. pok.; (f2) kwas hydrokwawowy (HCA), DIC, Oxyma pure, DIPEA, 4h w temp. pok.; (f3) kwas 1-H-benzimidazolo-5-

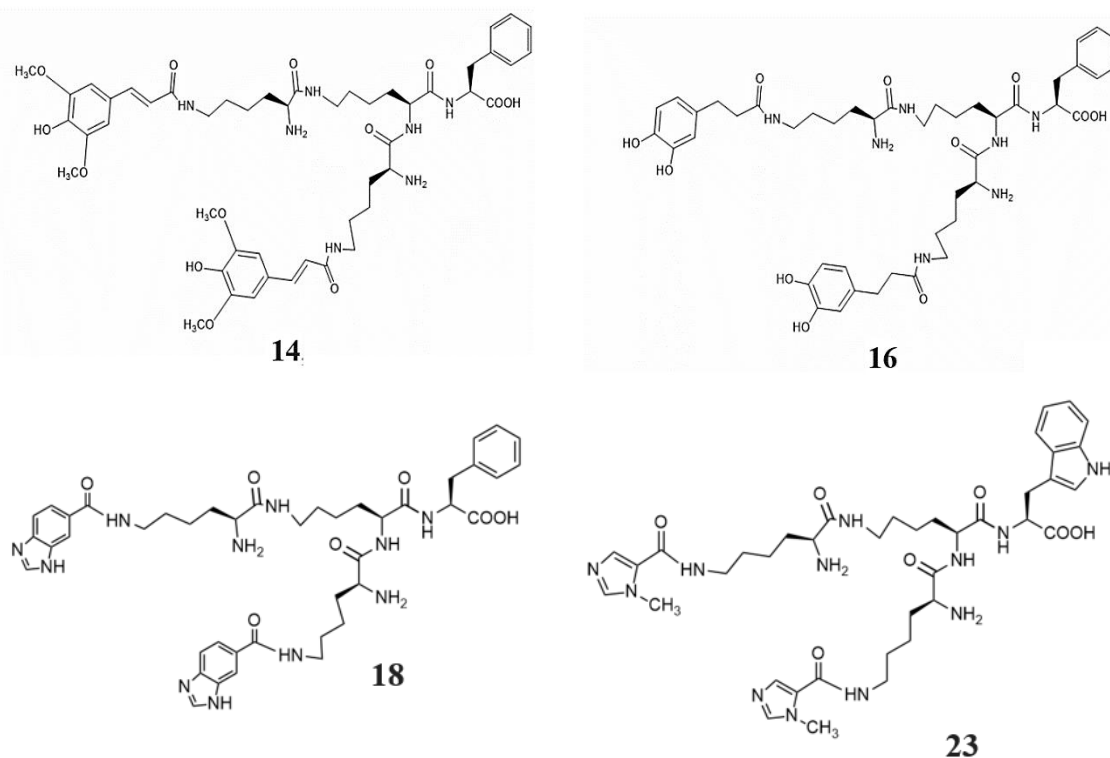
karboksylowy (IMD), HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (g) 50%TFA/DCM, 2h w temp. pok..
Wydajności: dla związku **14** - 18%; dla związku **16** - 13,9 %; dla związku **18** – 11,3 %.

Podobnie na żywicy 2CL, prowadząc syntezę manualnie w temp. pokojowej otrzymałem związek **23**.



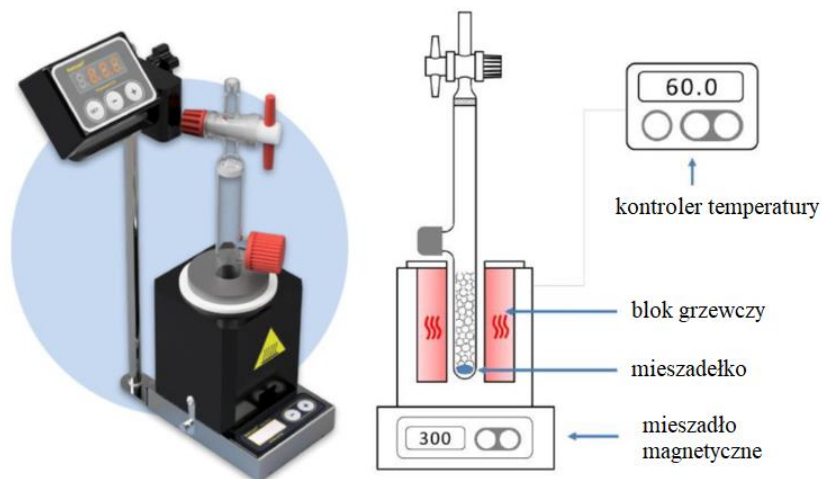
Schemat 3. Synteza dendronu **23** na żywicy 2-chlorotrytylowej. Reagenty i warunki: (a) 20% piperodyna, 2x5 min w temp. pok.; (b) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (c) 20% piperodyna, 2x10 min w temp. pok.; (d) Boc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (e) 20% piperodyna, 2x10 w temp. pok.; (f) kwas 1-metylo-1H-imidazolo-5-karboksylowy, HATU, DIPEA, 4h w temp. pok.; (g) 50%TFA/DCM, 4h w temp. pok..
Wydajność: 9,2%.

Wzory strukturalne otrzymanych dendronów **14**, **16**, **18** i **23** na żywicy 2CL przedstawiono na rys. 30.



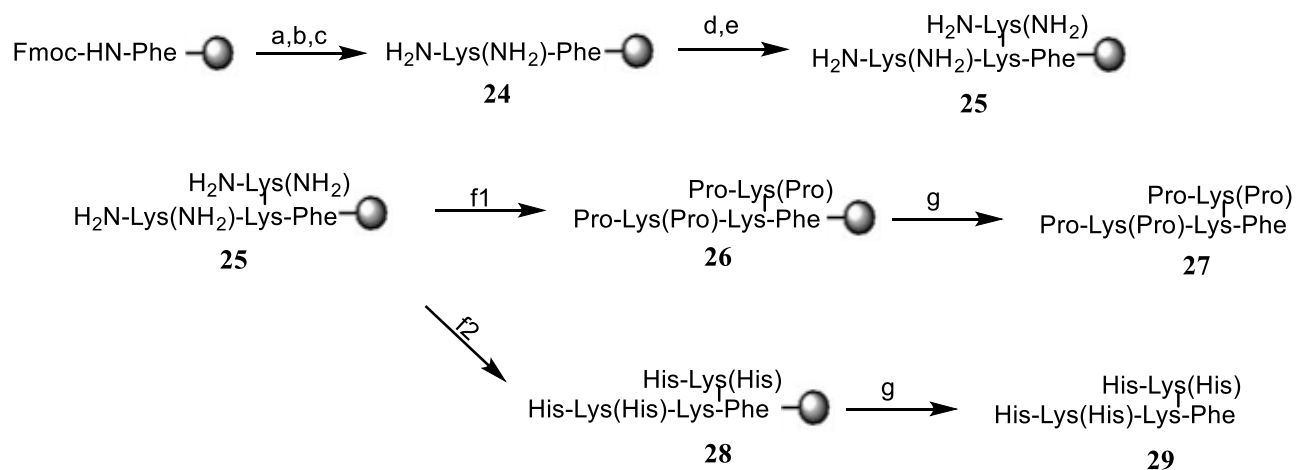
Rys. 30. Wzory strukturalne związków **14**, **16**, **18** i **23**.

Syntezę dendronów **14**, **16**, **18**, **23** prowadziłem manualnie w temperaturze pokojowej na żywicy 2CL, natomiast pozostałe związki były syntezowane z użyciem małego reaktora przedstawionego na Rys. 31 oraz z zastosowaniem żywicy Tenta Gel S PHB w temperaturze 60°C.

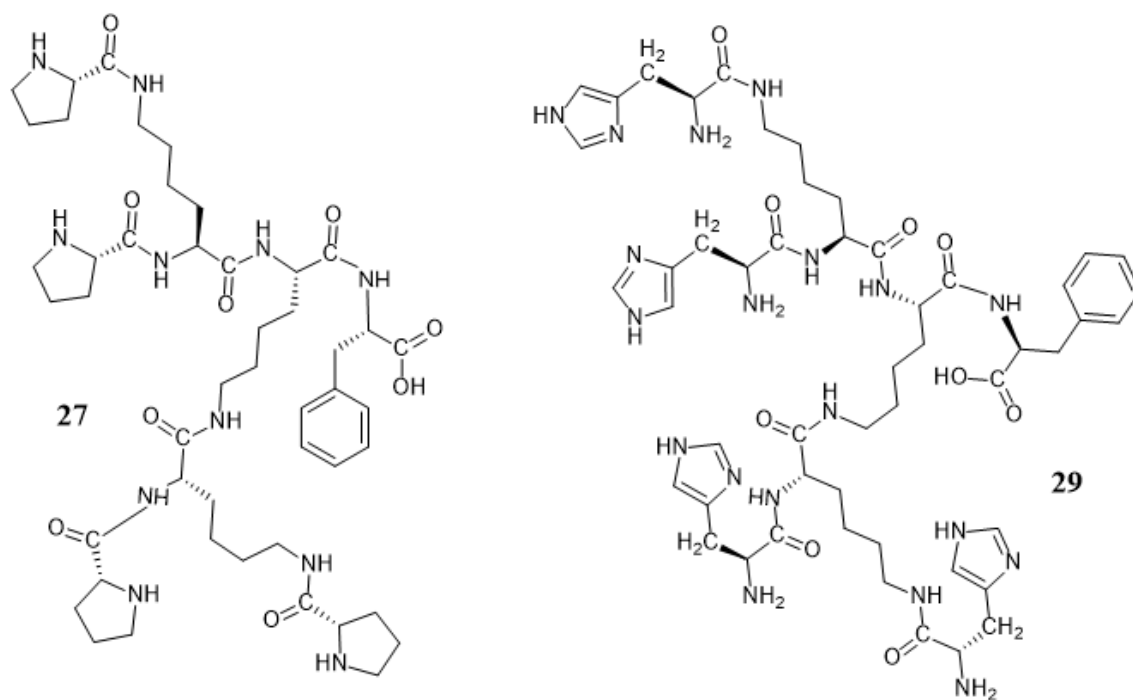


Rys. 31. Reaktor do prowadzenia syntezy na żywicy w podwyższonej temperaturze.

W przypadku syntezy dendronów zawierających na obrzeżach aminokwasy takie jak histydyna, prolina lub arginina odpowiednią żywicę stanowiła Tenta Gel S PHB. Przykładowy schemat syntezy dendronu zawierającego prolinę (**27**) lub histydyne (**29**) przedstawiono poniżej.

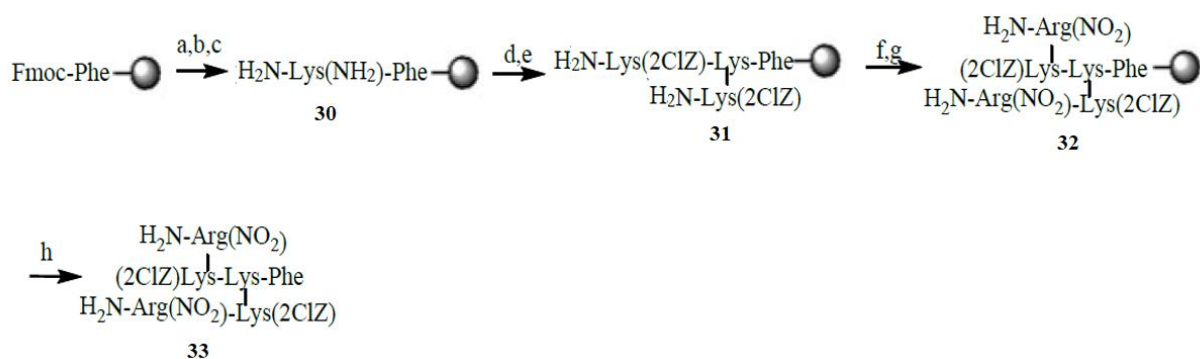


Schemat 4. Synteza dendronu lizynowego zawierającego prolinę (**27**) lub histydyne (**29**).
 Reagenty i warunki: (a) 20% piperydyna/DMF; (b) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA; (c) 20% piperydyna/DMF; (d) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA; (e) 20% piperydyna/DMF; (f1) Fmoc-Pro-OH, HATU, DIPEA; (f2) Boc-His-OH, HATU, DIPEA; (g) 90% TFA/H₂O, triizopropylsilan. Wydajności: dla związku **27** – 43,7%; dla związku **29**- 32,4%.

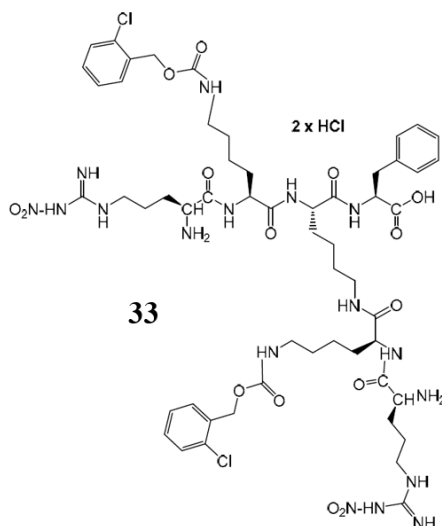


Rys. 32. Wzory strukturalne związków **27** i **29**.

Z kolei synteza dendronu lizynowego zawierającego argininę (**33**) przebiegała w sposób przedstawiony na schemacie 5.



Schemat 5. Synteza dendronu lizynowego zawierającego argininę (**33**). Reagenty i warunki: (a) 20% piperodyna/DMF; (b) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIPEA; (c) 20% piperodyna/DMF; (d) Fmoc-Lys(2-Cl-Z)-OH, HATU, DIPEA, (e) 20% piperodyna/DMF; (f) Fmoc-Arg(NO₂)-OH, HATU, DIPEA; (g) 20% piperodyna/DMF; (h) 90% TFA/H₂O. Wydajność: 51,85%.

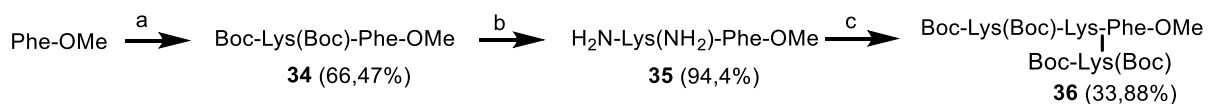


Rys. 33. Wzór strukturalny związku **33**.

Podsumowując, synteza na nośniku stałym umożliwia otrzymanie sfunkcjonalizowanych dendronów, pozwala na skrócenie czasu reakcji, eliminuje pośrednie etapy wyodrębniania i oczyszczania związków pośrednich, jednakże ilość otrzymanych finalnie oczyszczonych związków jest mała, a wydajność syntezy bywa niska. Ponadto, otrzymanie związku, który po odszczepieniu od żywicy mógłby ulegać dalszym reakcjom lub funkcjonalizacji jest skomplikowane ze względu na warunki syntezy i odszczepiania podczas, których następuje usuwanie grup ochronnych np. Boc. Z kolei związki, które po odszczepieniu od żywicy posiadają osłony Fmoc są trudno rozpuszczalne i przysparzają wiele problemów podczas oczyszczania. Tak więc kolejnym etapem była próba syntezy dendronów metodą estrów aktywnych w roztworze w celu otrzymania większej ilości związków, które ponadto stanowić mogą produkty pośrednie do dalszych reakcji bądź modyfikacji.

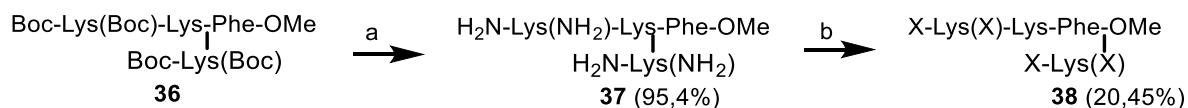
1.3 Synteza dendronów lizynowych w roztworze

Synteza dendronów lizynowych w roztworze metodą estrów aktywnych przebiegała w sposób przedstawiony na Schemacie 6.

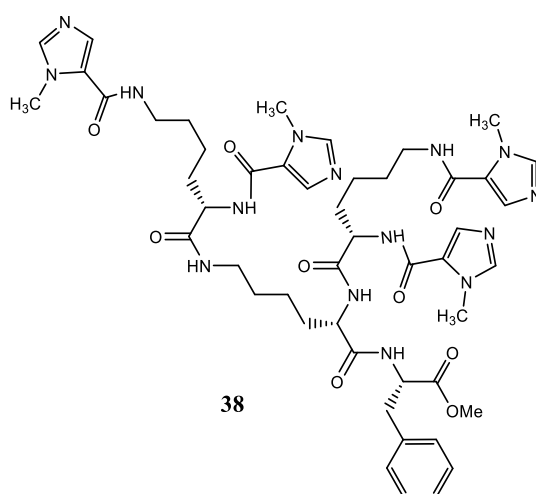


Schemat 6. Synteza dendronu lizynowego w roztworze. Warunki i reagenty: (a) Boc-Lys(Boc)-OH, DCC/HOAt, THF, Et₃N, 72 godz., t. pok., wydajność: 66,47%; (b) HCl/EtOAc, 4 godz., t. pok., wydajność: 94,4%; (c) Boc-Lys(Boc)-OH, DCC/HOAt, THF, Et₃N, 120 godz, t. pok., wydajność: 33,88%.

Następnie obrzeża otrzymanego dendronu lizynowego poddałem funkcjonalizacji za pomocą kwasu 1-metylo-1H-imidazolo-5-karboksylowego otrzymując lizynowy dendron zawierający na obrzeżach metylimidazol (**38**), co przedstawiono na Schemacie 7.



Schemat 7. Funkcjonalizacja dendronu lizynowego. Warunki i reagenty: (a) HCl/EtOAc, 4 godz., t. pok., wydajność: 95,4%; (b) X - kwas 1-metylo-1H-imidazolo-5-karboksylowy, DCC/HOAt, THF, Et₃N, 96 godz, t. pok., wydajność: 20,45%.

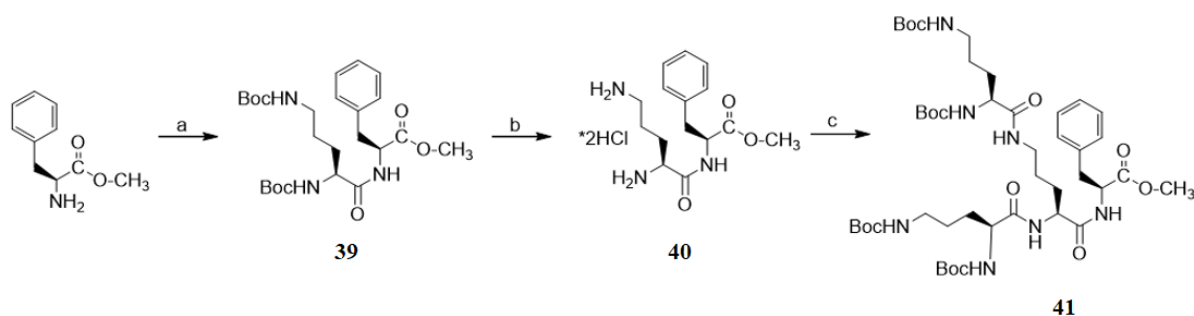


Rys. 34. Wzór strukturalny związku **38**.

Inne dendrony lizynowe sfunkcjonalizowane proliną, histydyną lub arginina zostały otrzymane w wyniku syntezy na nośniku stałym co opisano powyżej – związki **27**, **29** i **33**.

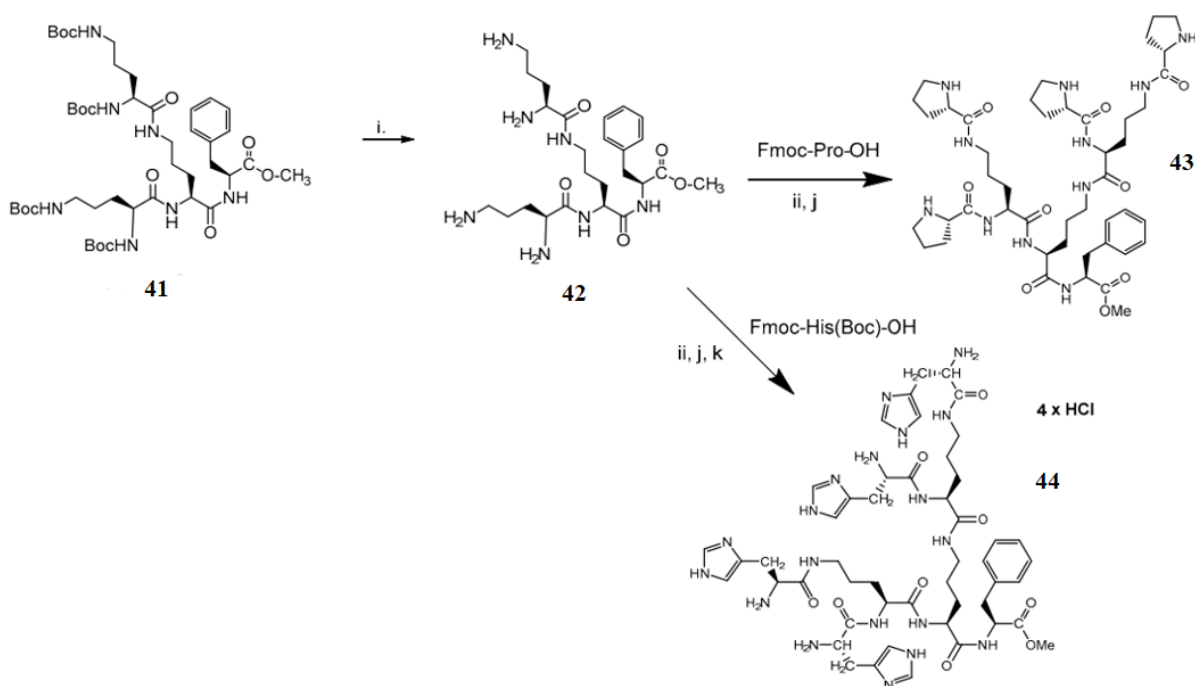
1.4 Synteza dendronów ornitynowych w roztworze

W wyniku braku danych literaturowych odnośnie syntezy dendronów poli-ornitynowych zdecydowałem się na syntezę dendronów, w których elementem rozgałęziającym będzie ornityna (Schemat 8). Ponadto, użycie innego aminokwasu rozgałęziającego niż powszechnie stosowana lizyna umożliwi konstrukcję dendronów o nowych właściwościach fizykochemicznych.



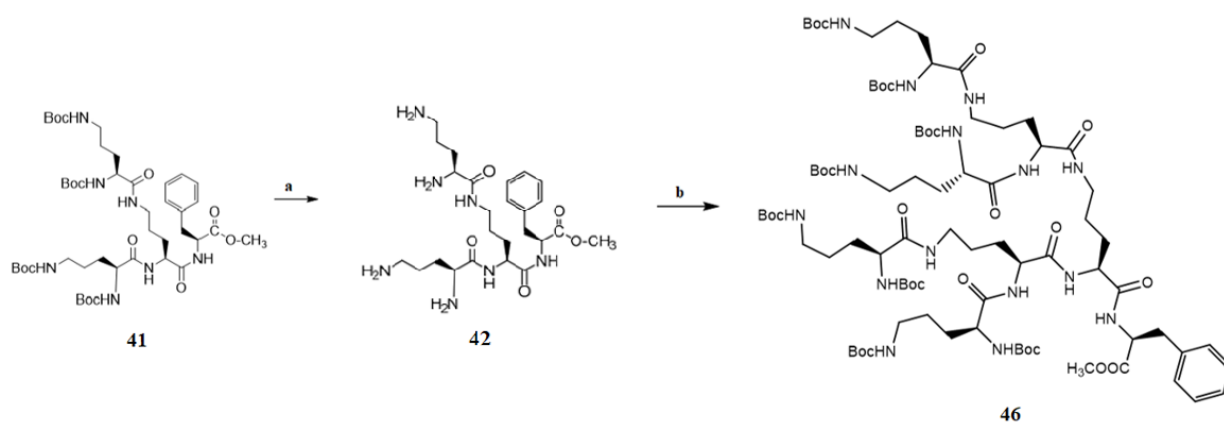
Schemat 8. Synteza Boc-chronionego dendronu ornitynowego (**41**). Reagenty i warunki: (a) Boc-Om(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 72 godz., t. pok., wydajność: 90,8%; (b) HCl/EtOAc, 4 godz., t. pok., wydajność: 98,2%; (c) Boc-Om(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 72 godz, t. pok., wydajność: 94,1%.

Dendron ornitynowy (**41**) został następnie poddany funkcjonalizacji proliną oraz histydyną, co doprowadziło do otrzymania odpowiednio związku **43** i **44**. Syntezę obu związków prowadzono w roztworze co pokazano na Schemacie 9.



Schemat 9. Synteza sfunkcjonalizowanych dendronów ornitynowych proliną (**43**) i histydyną (**44**). Reagenty i warunki: (i) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok., (ii) Fmoc-Pro-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 126 h, temp. pok. lub Fmoc-His(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 126 h, temp. pok.; (j) 20% piperidyna/MeOH; (k) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok. Wydajność dla związku **43** – 66,7%; dla związku **44** – 49,68%

Dendron ornitynowy (**41**) został także poddany dalszej rozbudowie za pomocą ornityny, co doprowadziło do otrzymania ornitynowego dendronu II generacji (**46**). Syntezę związku **46** prowadzono w roztworze, co pokazano na Schemacie 10.



Schemat 10. Synteza dendronu II-giej generacji. Reagenty i warunki: (a) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok., wydajność: 89,4%, (b) Boc-Orn(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 168 godz., t. pok., wydajność: 34,7%

W wyniku przeprowadzonych reakcji można wysnuć ważne wnioski dotyczące otrzymywania dendronów ornitynowych i lizynowych zarówno metodą syntezy w roztworze jak i na nośniku stałym. Metoda syntezy w roztworze umożliwia otrzymanie dużej ilości dendronów, pozwala na lepszą kontrolę przebiegu reakcji pośrednich poprzez wyodrębnianie i oczyszczanie związków pośrednich, a wydajność syntezy jest znacznie większa niż w przypadku syntezy na nośniku stałym. Jednakże, czas poszczególnych reakcji znacznie się wydłuża, a ilość pracy prowadząca do uzyskania pożądanego związku jest znacznie większa. Ponadto dendrony ornitynowe ze względu na mniejsze zawady steryczne lepiej syntetyzuje się w roztworze niż dendrony lizynowe. Natomiast gdy aminokwasem rozgałęziającym jest lizyna preferowaną metodą syntezy jest synteza na odpowiednio dobranym nośniku stałym. Podsumowanie metod syntetycznych dendronów znajduje się w Tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie metod syntetycznych dendronów – synteza na nośniku stałym oraz synteza w roztworze.

	Synteza na nośniku stałym	Synteza w roztworze
Aminokwas	lizyna	ornityna
Czas reakcji	krótki (4-6h)	długi (do 120h)
Produkty pośrednie	synteza ciągła, oczyszczanie dopiero po odszczepieniu od nośnika	synteza “krok po kroku” z wydzieleniem i oczyszczaniem produktów pośrednich
Odczynniki sprzęgające	HATU, DIPEA lub DIC/Oxyma pure, DIPEA	DCC/HOBt
Kontrola	test Kaisera	płytki TLC

Podsumowując przeprowadzone syntezy, na wydajność reakcji wpływa zarówno wybór żywicy jak i stopień jej osadzenia. W przypadku syntez prowadzonych na żywicy 2-chlorotrytylowej o osadzeniu 0,82 mmol/g uzyskuje się niewielką ilość czystego dendronu (w zakresie ok.50 mg – 142 mg), a wydajność otrzymywania dendronów wynosi pomiędzy 9,2 a 18 %.

W przypadku syntez prowadzonych na żywicy Tenta Gel S PHB o osadzeniu 0,25 mmol/g uzyskuje się niewielką ilość czystego dendronu (w zakresie 56 mg – 334 mg), ale wydajność otrzymywania dendronów wynosi pomiędzy 21,3 a 51,85 %. Na poprawę wydajności wpływa korzystnie niższe osadzenie żywicy.

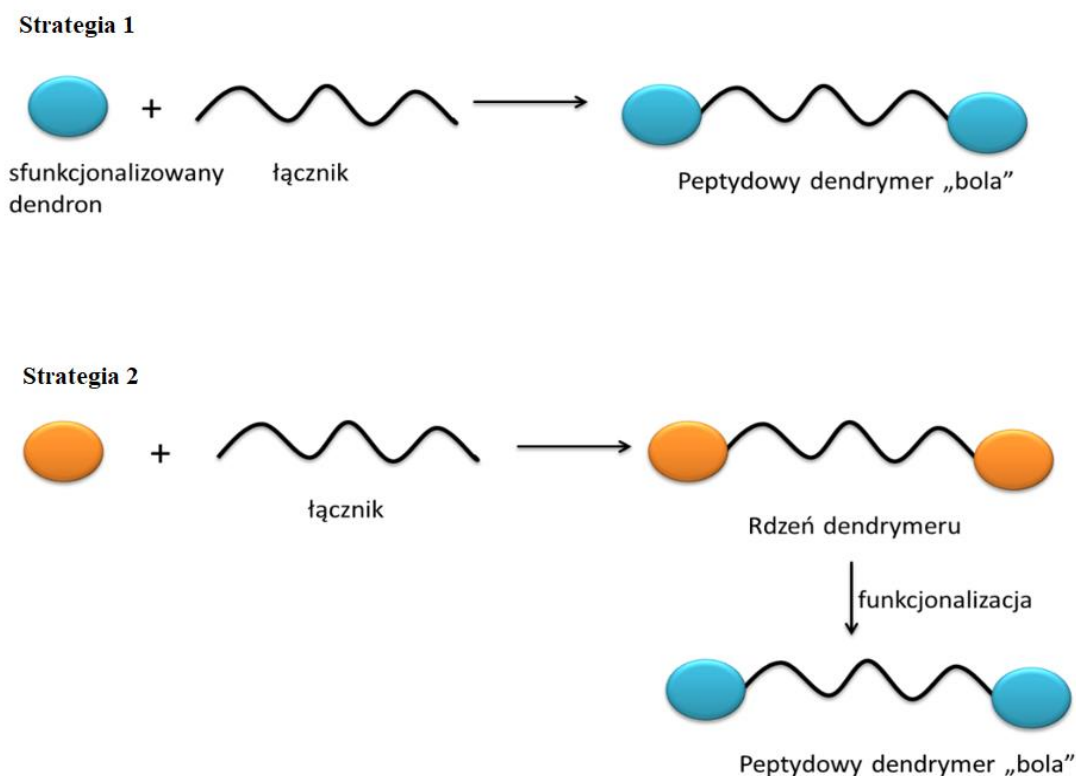
Z kolei w przypadku syntez prowadzonych w roztworze z zastosowaniem metodologii klasycznej syntezy peptydów uzyskuje się znacznie większą ilość związku rzędu kilka gramów, a wydajności otrzymywania związków są również wyższe. W przypadku niesfunkcjonalizowanego dendronu ornitynowego otrzymano 3,82 g związku z wydajnością 94%, a w przypadku niesfunkcjonalizowanego dendronu lizynowego otrzymano 0,98 g związku z całkowitą wydajnością 64,9 %.

Natomiast dendron ornitynowy sfunkcjonalizowany proliną otrzymano z wydajnością 66,7%, a dendron ornitynowy sfunkcjonalizowany histydyną otrzymano z wydajnością 49,68 %.

Ponadto w wyniku prowadzonych prac otrzymano 1,35 g dendronu ornitynowego II generacji z wydajnością 34,7 %.

2. Synteza dendrymerów typu „bola” w roztworze

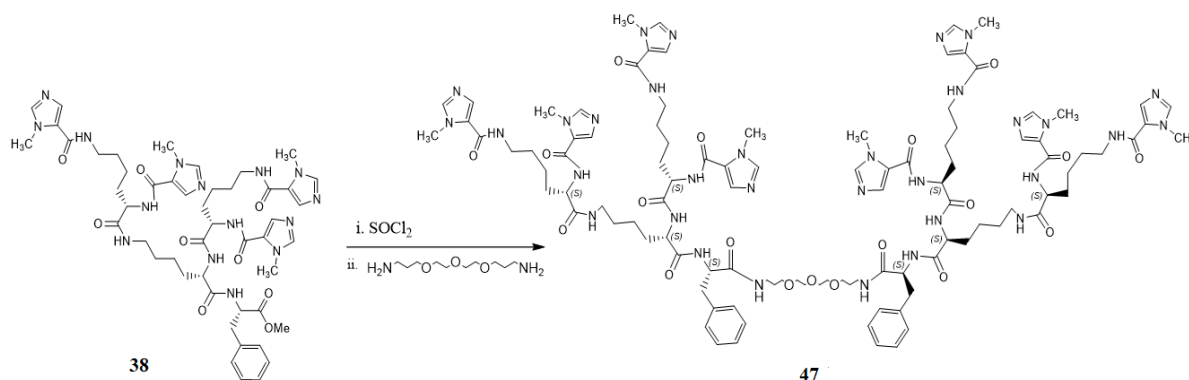
Ostatnim celem była synteza unikalnych peptydowych dendrymerów typu „bola” w roztworze. Związki te składające się z dwóch peptydowych dendronów połączonych organicznym łącznikiem posiadają ciekawe właściwości fizykochemiczne. Nie tylko są aktywne biologicznie „*per se*”, ale także mogą mieć potencjalne zastosowanie w celowym dostarczaniu leków i terapii genowej, ponieważ mają zdolność do tworzenia supramolekularnych kompleksów z lekami lub materiałem genetycznym. W pierwszym etapie ważny był wybór i synteza odpowiednich łączników organicznych, w tej grupie znalazły się łączniki amidowe, estrowe oraz zawierające mostki disiarczkowe. Kolejnym ważnym aspektem okazała się strategia syntezy pożądanego dendrymeru. Według pierwszej strategii syntezy łącznik został przyłączony dopiero do sfunkcjonalizowanego dendronu (posiadającego na obrzeżu prolinę, histydynę lub imidazol), który prowadził do otrzymania pożądanego związku. Natomiast w przypadku drugiej metody łącznik był przyłączony do zabezpieczonego i niesfunkcjonalizowanego dendronu prowadząc w ten sposób do otrzymania rdzenia dendrymeru, który w ostatnim etapie był funkcyjonalizowany doprowadzając ostatecznie do otrzymania dendrymeru typu „bola”.



Rys. 35. Dwie strategie syntezy dendrymerów typu „bola”

2.1 Synteza według strategii 1

Przystąpiłem do syntezy dendrymeru typu „bola” według pierwszej metodologii, w pierwszym etapie C-koniec wcześniej otrzymanego lizynowego dendronu **38** przekształciłem w jego chlorek kwasowy wykorzystując reakcję Schotten-Baumanna w celu bardziej wydajnego przyłączenia łącznika do dendronu w drugim etapie syntezy, a jako łącznik zastosowałem 4,7,10-trioksa-1,13-tridekanodiaminę.



Schemat 11. Synteza lizynowego dendrymeru typu „bola” zawierającego metyloimidazol (**47**) według pierwszej metodologii. Warunki i reagenty: (i) SOCl_2 , Et_3N , DCM, 8 h, temp. pok., (ii) Łącznik – 4,7,10-trioksa-1,13-tridekanodiamina, Et_3N , DCM, 44 h, temp. pok.. Wydajność: 11,32%.

Synteza dendrymeru **47** z zastosowaniem klasycznej metody sprzęgania aminokwasów nie następowała, nie obserwowano progresji reakcji, dlatego zastosowałem reakcję Schotten-Baumanna.

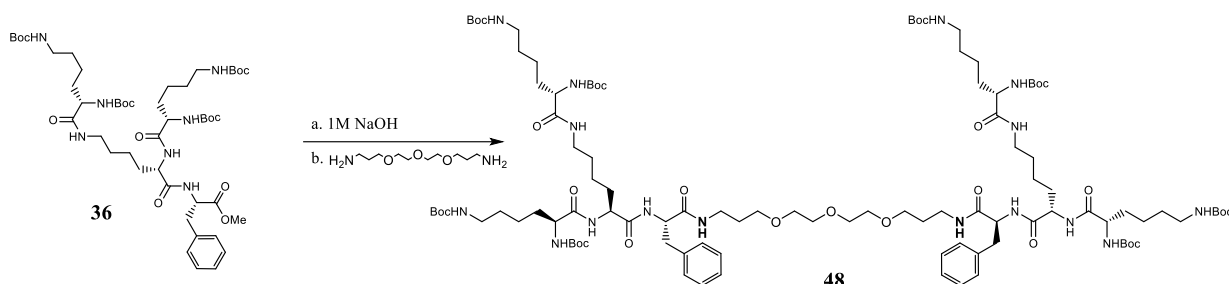
Synteza dendrymeru według pierwszej metodologii okazała się problematyczna, trudno było sfunkcjonalizować dendron oraz wprowadzić łącznik. Zastosowanie w ostatnim etapie reakcji Schotten-Baumanna skróciło czas reakcji, ale nieznacznie wpłynęło na wydajność, która w przypadku tej reakcji pozostawała bardzo niska.

2.2 Synteza według strategii 2

Rozpocząłem syntezę kolejnych dendrymerów typu „bola” według drugiej zaproponowanej metodologii. Najpierw przystąpiłem do syntezy rdzeni dendrymerów „bola” – lizynowych, ornitynowych oraz z mostkiem disiarczkowym.

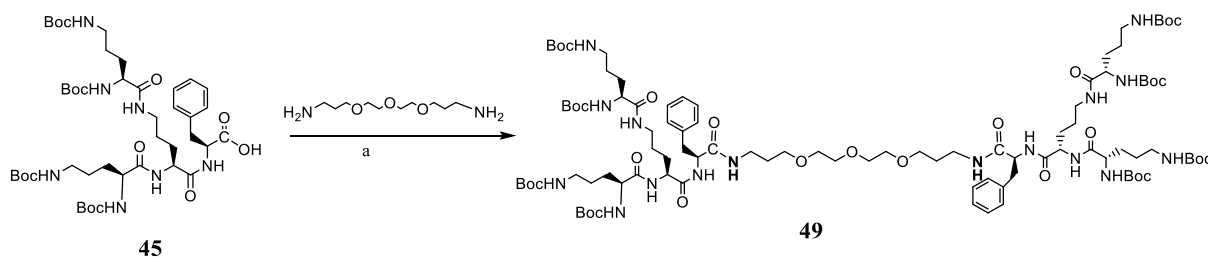
2.2.1 Synteza rdzeni dendrymerów typu „bola”

Rdzeń lizynowego dendrymeru „bola” **48** otrzymałem w sposób przedstawiony na Schemacie 12.



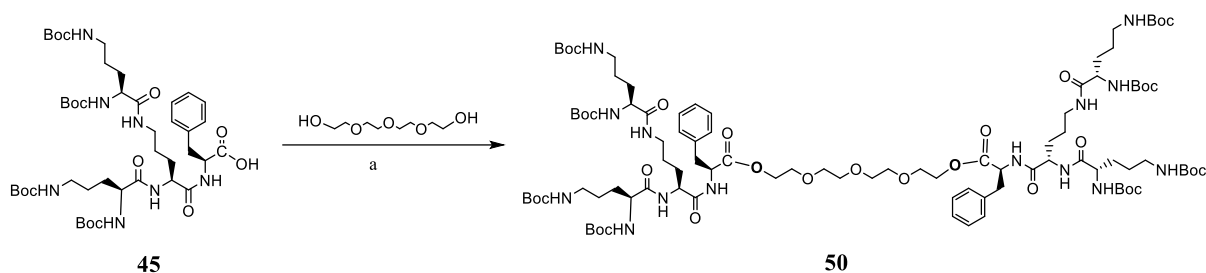
Schemat 12. Synteza rdzenia lizynowego dendrymeru „bola” (**48**). Warunki i reagenty: (a) 1M NaOH, 6 godz., t. pok.; (b) Łącznik - 4,7,10-trioksa-1,13-tridekanodiamina, DCC/HOSu, MeOH/THF, Et₃N, 96 godz. t. pok.. Wydajność: 51,7%.

Następnie przystąpiłem do syntezy ornitynowych rdzeni dendrymerów „bola” gdzie jako element rozgałęziający stosowałem ornitynę, która jak wynikało z wcześniejszych doświadczeń jest zdecydowanie lepsza niż lizyna podczas syntezy w roztworze. Otrzymałem dwa nowe dendrymerowe rdzenie – jeden trwały zawierający mostki amidowe (**49**) oraz drugi biodegradowalny z mostkami estrowymi (**50**). Synteza związku **49** przebiegała zgodnie ze Schematem 13.



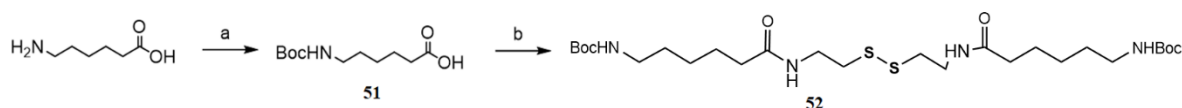
Schemat 13. Synteza Boc-zabezpieczonego dendrymeru „bola” (**49**) z mostkami amidowymi. Warunki i reagenty: (a) Łącznik - 4,7,10-trioksa-1,13-tridekanodiamina, DCC/HOSu, Et₃N, MeOH/THF, 96 godz. t. pok. Wydajność 66,9%.

Synteza związku **50** z biodegradowalnymi mostkami estrowymi przebiegała zgodnie ze Schematem 14.



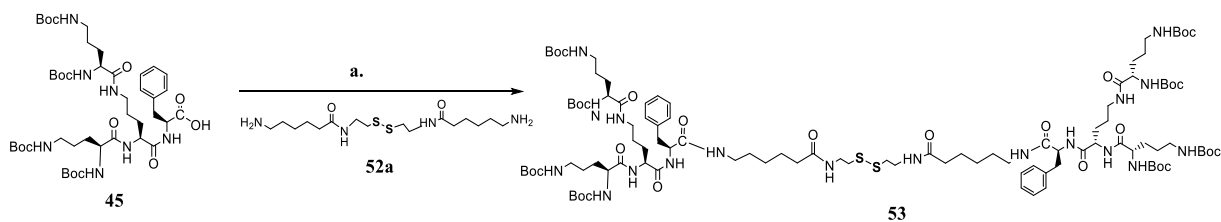
Schemat 14. Synteza Boc-zabezpieczonego dendrymeru „bola” (**50**) z mostkami estrowymi. Warunki i reagenty: (a) glikol polietylenowy, DCC/DMAP, THF, 96 godz. t. pok.. Wydajność 58,1%.

Kolejnym celem było otrzymanie rdzenia redoks aktywnego dendrymeru typu „bola”. Zadanie to rozpocząłem od syntezy odpowiedniego łącznika, który w swojej budowie zawiera mostek disiarczkowy. Po przygotowaniu zabezpieczonego grupą Boc kwasu ε-aminokapronowego (**51**) i poddaniu go w kolejnym etapie reakcji z cystaminą otrzymałem zabezpieczony łącznik (**52**) posiadający w swojej strukturze mostek disiarczkowy.



Schemat 15. Synteza łącznika zawierającego mostek disiarczkowy. Warunki i reagenty: (a) NaHCO₃, Boc₂O, MeOH/H₂O; (b) DCC/HOSu, THF, Et₃N, cystamina, 96 godz. t. pok.. Wydajność: 51,6%.

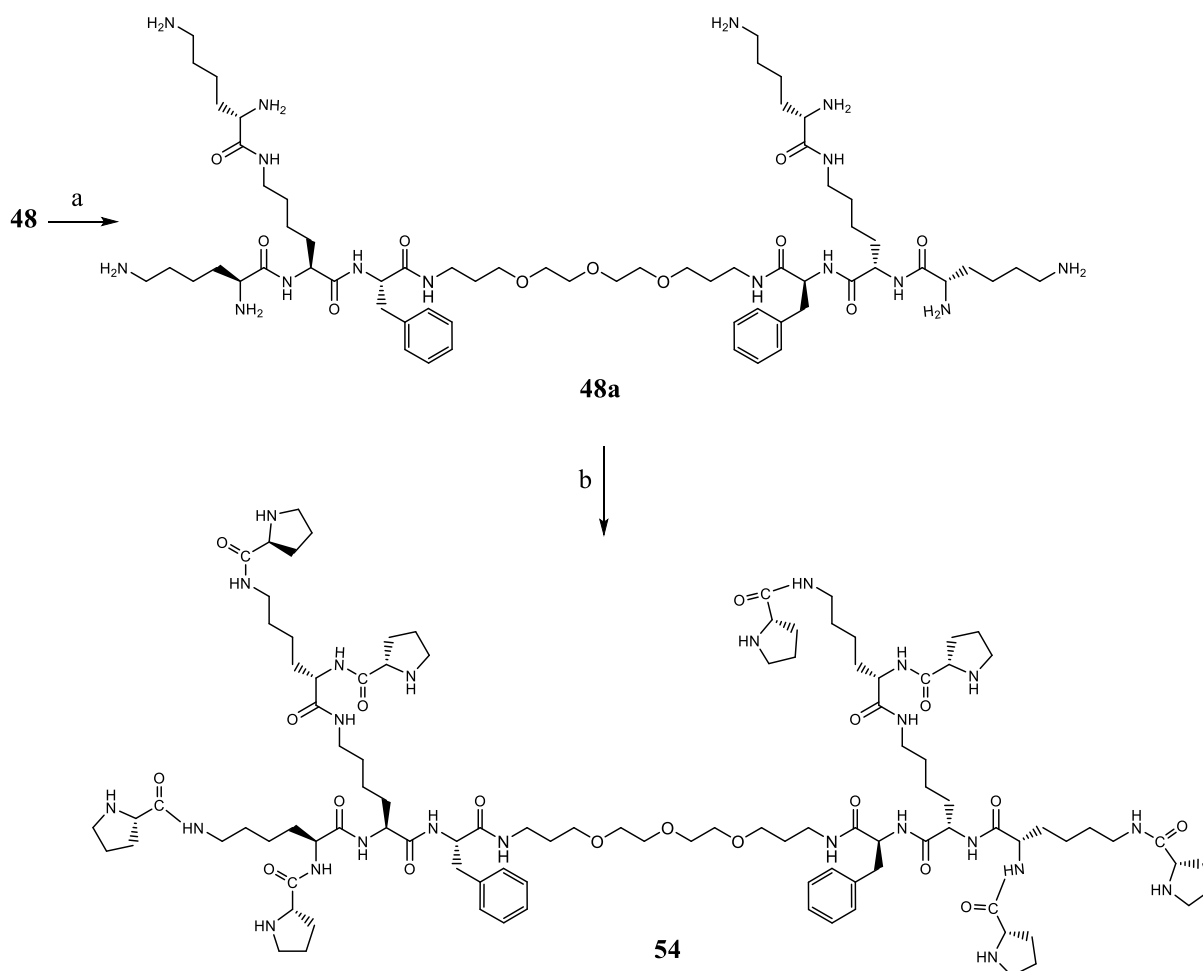
Odbezpieczony łącznik **52a** użyłem następnie do kolejnej reakcji z wcześniej otrzymanym ornitynowym dendronem (**45**) uzyskując pożądaną rdzeń dendrymeru „bola” z mostkiem disiarczkowym (**53**).



Schemat 16. Synteza zabezpieczonego dimeru „bola” zawierającego mostek disiarczkowy. Warunki i reagenty: (a) DCC/HOSu, THF, Et₃N, łącznik siarkowy (**52a**), 330 godz. t. pok. w atmosferze argonu. Wydajność: 41%.

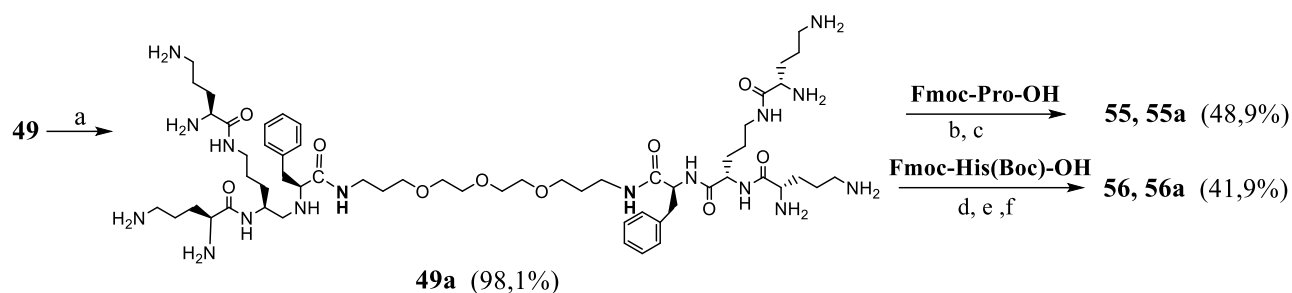
2.2.2 Funkcjonalizacja wybranych rdzeni dendrymerów „bola”

W kolejnym, finalnym etapie przystąpiłem do funkcyjnalizacji wcześniej otrzymanych rdzeni dendrymerów „bola”. Dendrymer lizynowy **48** sfunkcyjnalizowałem proliną uzyskując finalny dendrymer **54**. Synteza przebiegała według Schematu 17.

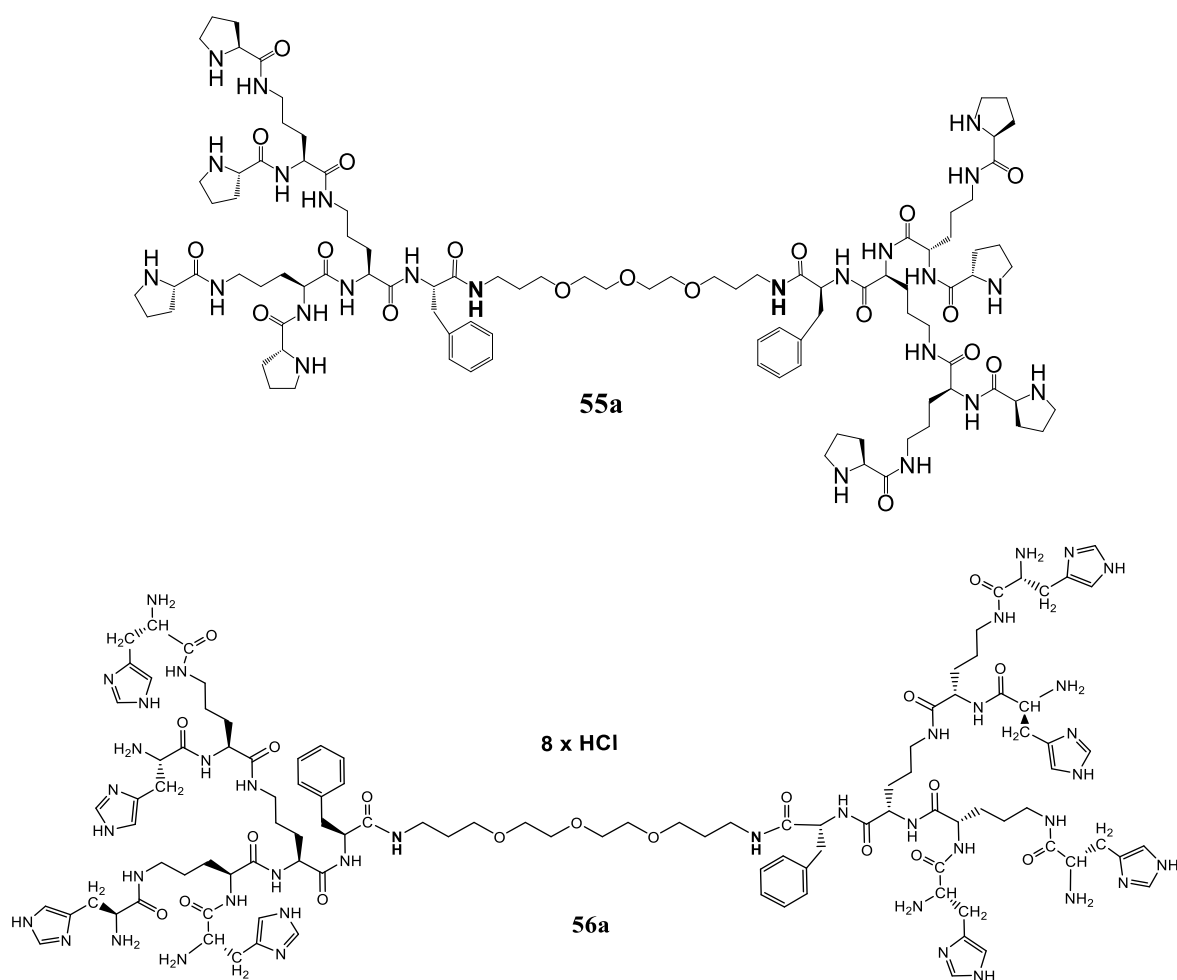


Schemat 17. Funkcyjnalizacja lizynowego dendrymeru „bola” proliną. Warunki i reagenty: (a) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok., (b) Fmoc-Pro-OH, DCC/HOSu, THF, Et₃N, 126 h, temp. pok., a następnie 20% piperydyna/MeOH; Wydajność: 37,4%.

Dendrymer ornitynowy **49** sfunkcyjnalizowałem proliną uzyskując finalny dendrymer **55a**, a także histydyną uzyskując finalny dendrymer **56a**. Synteza przebiegała według Schematu 18.

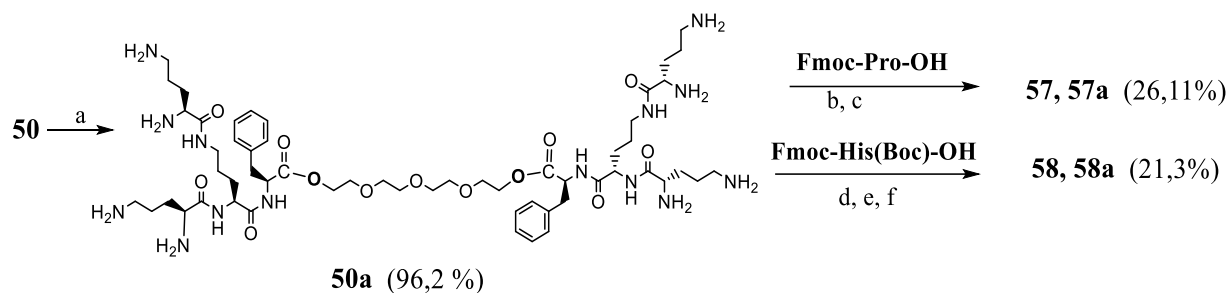


Schemat 18. Synteza dendrymerów „bola” **55a** i **56a**: (a) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok.; (b) Fmoc-Pro-OH, DCC/HOSu, THF, 126 godz., t. pok.; (c) tris(2-aminoetylo)amina/MeOH, 8 godz., t. pok.; (d) Fmoc-His(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, 126 godz., t. pok.; (e) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok.; (f) tris(2-aminoetylo)amina/MeOH, 8 godz., t. pok.;

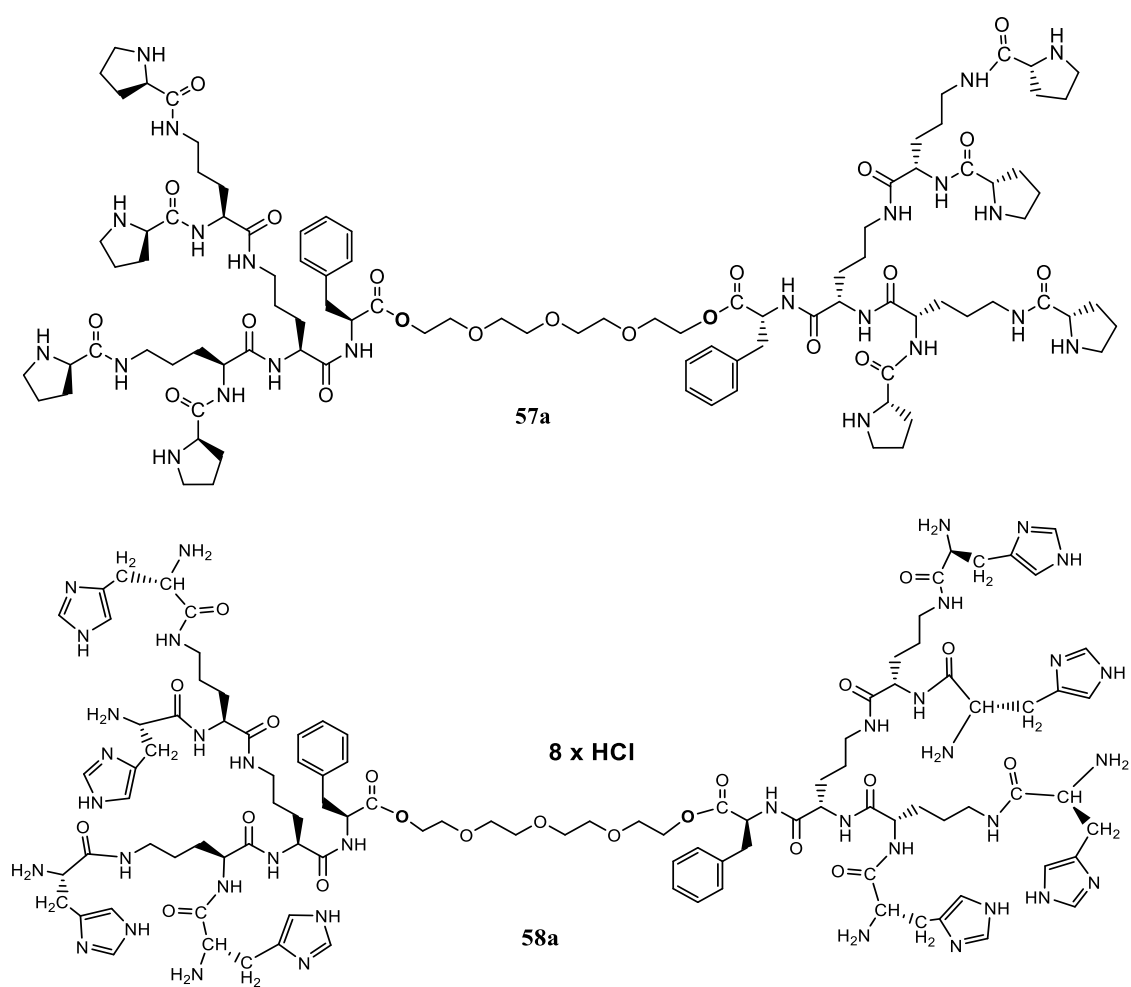


Rys. 36. Wzory strukturalne dendrymerów **55a** oraz **56a**.

Dendrymer ornitynowy z mostkami estrowymi **50** sfunkcjonalizowałem proliną uzyskując finalny dendrymer **57a**, a także histydyną uzyskując finalny dendrymer **58a**. Synteza przebiegała według schematu 19.

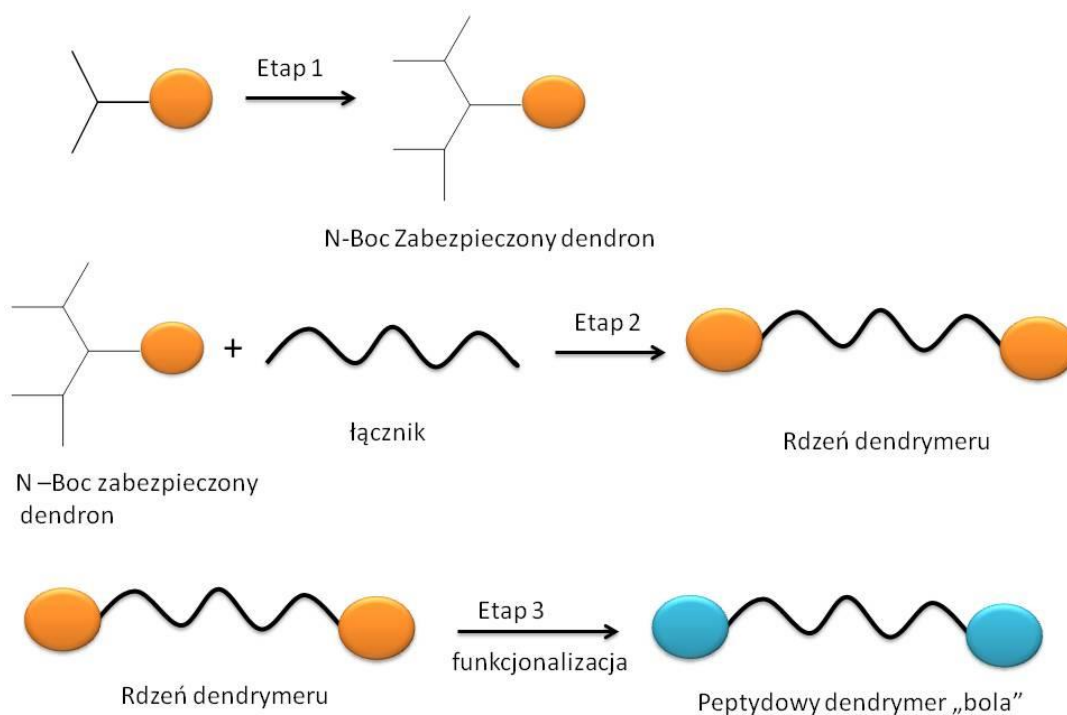


Schemat 19. Synteza dendrymerów „bola” **57a** i **58a**: (a) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok.; (b) Fmoc-Pro-OH, DCC/HOSu, THF, 126 godz., t. pok.; (c) tris(2-aminoetylo)amina/MeOH, 8 godz., t. pok.; (d) Fmoc-His(Boc)-OH, DCC/HOSu, THF, 126 godz., t. pok.; (e) HCl/EtOAc, 8 godz., t. pok.; (f) tris(2-aminoetylo)amina/MeOH, 8 godz., t. pok.;



Rys. 37. Wzory strukturalne dendrymerów **57a** oraz **58a**.

Jak można zauważyć, w przypadku syntezy dendrymerów „bola” według drugiej metodologii wydajność poszczególnych etapów reakcji jest znacznie większa. Co więcej, ten sposób syntezy okazał się mniej problematyczny i umożliwił otrzymanie większych ilości dendrymerów typu „bola”.



Rys. 38. Podsumowanie opracowanej strategii syntezy dendrymerów „bola”.

3. BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE

3.1 Badania konformacji molekularnej dendrymerów o strukturze „bola” metodą dichroizmu kołowego (CD)

Samoorganizacja molekularna dendrymerów typu „bola” może mieć istotne znaczenie dla ich aktywności biologicznej. W przypadku zastosowania dendrymerów jako nanoonośniki leków właściwość ta może odgrywać także znaczącą rolę podczas rozpoznania molekularnego dendrymer/lek. Dlatego też podjęto badania zależnej od stężenia agregacji supramolekularnej w roztworze za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego (CD).

Widma dichroizmu kołowego dla sfunkcjonalizowanych proliną **55a** i **57a** lub sfunkcjonalizowanych histydyną **56a** i **58a** dendrymerów „bola” wykazują wzorce charakterystyczne również dla odpowiednich dendronów: sfunkcjonalizowanych proliną **43** lub sfunkcjonalizowanych histydyną **44**. Widma CD mierzone w MeOH wykazały, że żaden z dendrymerów „bola”, z wyjątkiem sfunkcjonalizowanego proliną dendrymeru **57a**, nie wykazuje śladów CD charakterystycznych dla większości liniowych AMP, gdzie konformacja α -helisy umożliwia sortowanie centrów kationowych i hydrofobowych (Rys. 39).

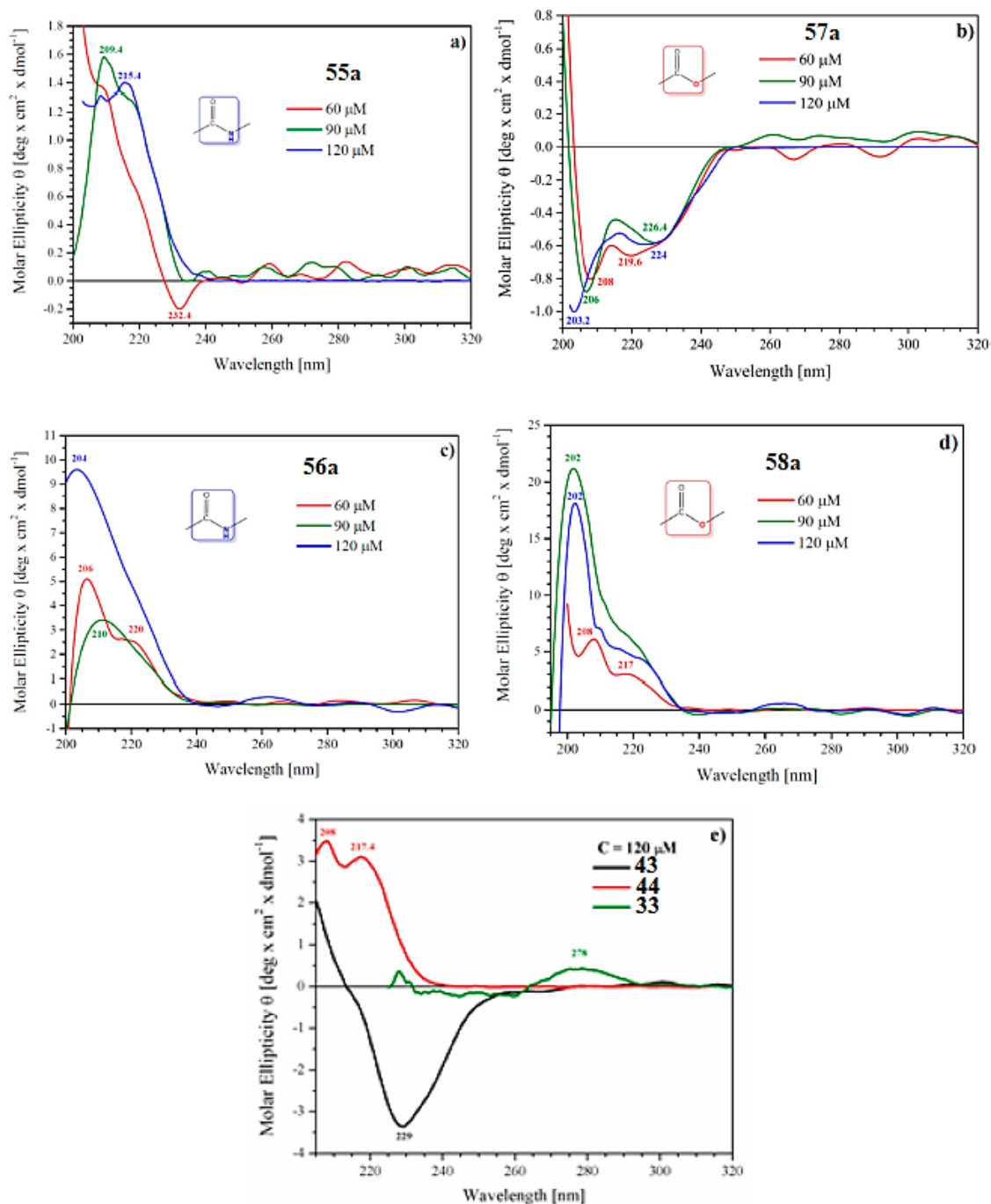
W związku z tym, amfifilowa struktura kationowych dendrymerów „bola” zakończonych histydyną **56a** i **58a** wynika raczej ze struktury chemicznej, a nie rearanżacji konformacyjnych. Wszystkie widma wykazują dodatni efekt Cottona o największej intensywności w okolicach 190-206 nm, bardziej intensywny dla dendrymerów z histydyną, charakterystyczny dla przejścia $n-\pi^*$ wiązania amidowego w różnych środowiskach chemicznych.

Spośród neutralnych, sfunkcjonalizowanych proliną dendrymerów „bola”, tylko dendrymer **57a** wykazuje ślad CD z ujemnymi pasmami wokół 208, 219 i siodłem przy 226 nm, co może tłumaczyć mieszaninę struktur drugorzędowych α -helisy i β -kartki w roztworze MeOH. Struktura β -kartki może być również postulowana dla monomerycznego dendronu **43**, wykazującego szerokie ujemne pasmo przy 239 nm.

Zupełnie inny kształt widma CD dla dendrymeru **55a**, który strukturalnie różni się od **57a** tylko dwoma wiązaniami estrowymi w miejsce amidowych w miejscu połączenia łącznik-dendron sugeruje, że oddziaływania międzycząsteczkowe mogą zachodzić przez niekwalencyjne oddziaływania typu głowa-głowa i głowa-łącznik.

Dendrymery sfunkcjonalizowane histydyną **56a** i **58a**, jak również dendron **43** wykazują dodatnie pasma wokół 206 i 220 nm przy stężeniu 60 μ M.

Przy wyższych stężeniach tracą one dyskretną strukturę i są zastępowane przez szerokie dodatnie pasmo z maksimum przy 202-204 nm, które prawdopodobnie obejmuje zakres struktur drugorzędowych powstałych podczas agregacji cząsteczek o nieco innym położeniu łańcuchów bocznych histydyny.



Rys. 39. Widma CD: dendrymerów o strukturze „bola” w MeOH; a,b) sfunkcjonalizowanych Pro; c,d) sfunkcjonalizowanych His; e) odpowiednich dendronów.

Podsumowując, widma CD sugerują, że dendrymery „bola” istnieją w roztworze MeOH jako mieszanina agregatów o wielu konformacjach. W przypadku dendrymerów z histydyną można postulować istnienie wielu wiązań wodorowych pomiędzy fragmentami imidazolowymi, w których prawdopodobnie pośredniczą aniony Cl⁻.

Widma CD wszystkich dendrymerów również zawierają minima w okolicach 200 nm, co może sugerować obecność agregatów o przypadkowej konformacji, przynajmniej w przypadku zawierających prolinę dendrymerów „bola”. Ponieważ widmo CD L-His zawiera ostre minimum przy 195,8 nm, konformacja losowa pochodnych zawierających histydynę jest mniej wiarygodna.

Badania konformacji molekularnej metodami dichroizmu kołowego zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Mają Morawiak w Instytucie Chemii Organicznej PAN, a wyniki zostały opublikowane w artykule Cieślak i wsp. [125]

3.2 Badanie właściwości antyoksydacyjnych

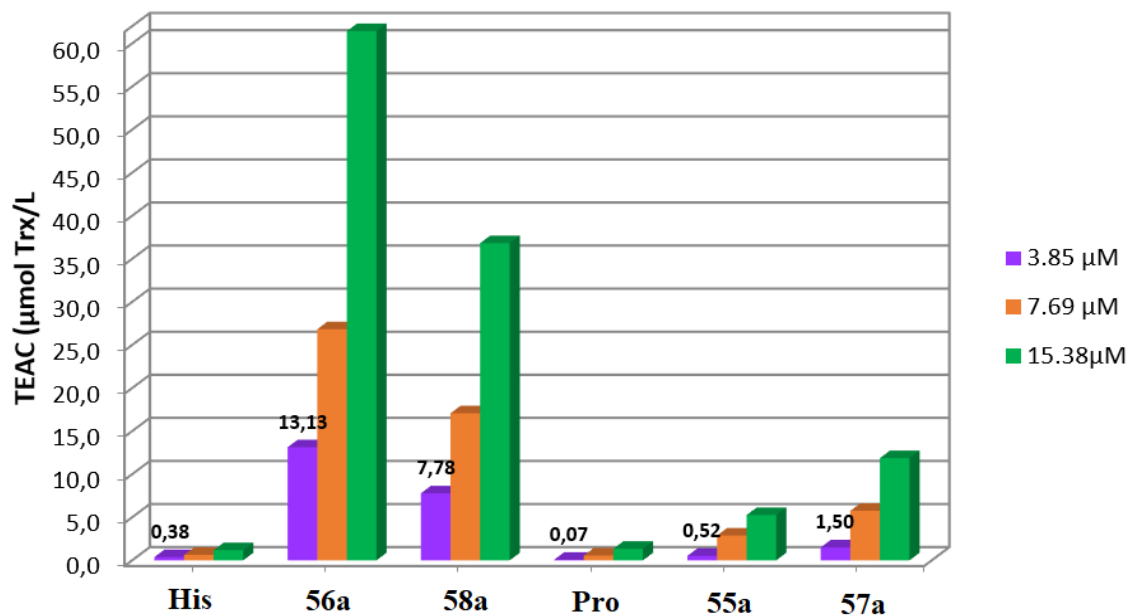
Badania aktywności redukującej testem FRAP i CUPRAC, a także zdolności zmiatania wolnych rodników tlenowych testem DPPH i ABTS zostały przeprowadzone przez dr inż. Maję Morawiak w Instytucie Chemii Organicznej PAN.

Badania miały na celu odpowiedź na następujące pytania:

- Czy własności redoks wykazują tylko dendrymery posiadające w strukturze fragmenty o udokumentowanych właściwościach przeciwutleniających, takich jak polifenole czy histydyna, czy też redoks aktywne są te posiadające prolinę dla której nie znaleziono żadnych danych w literaturze;
- Czy odpowiednia wartość otrzymana w testach jest sumą wartości dla odpowiedniego fragmentu czy też ważny jest wkład od struktury samego dendrymeru;
- Czy można znaleźć korelacje pomiędzy strukturą dendronu/dendrymeru a rodzajem testu.

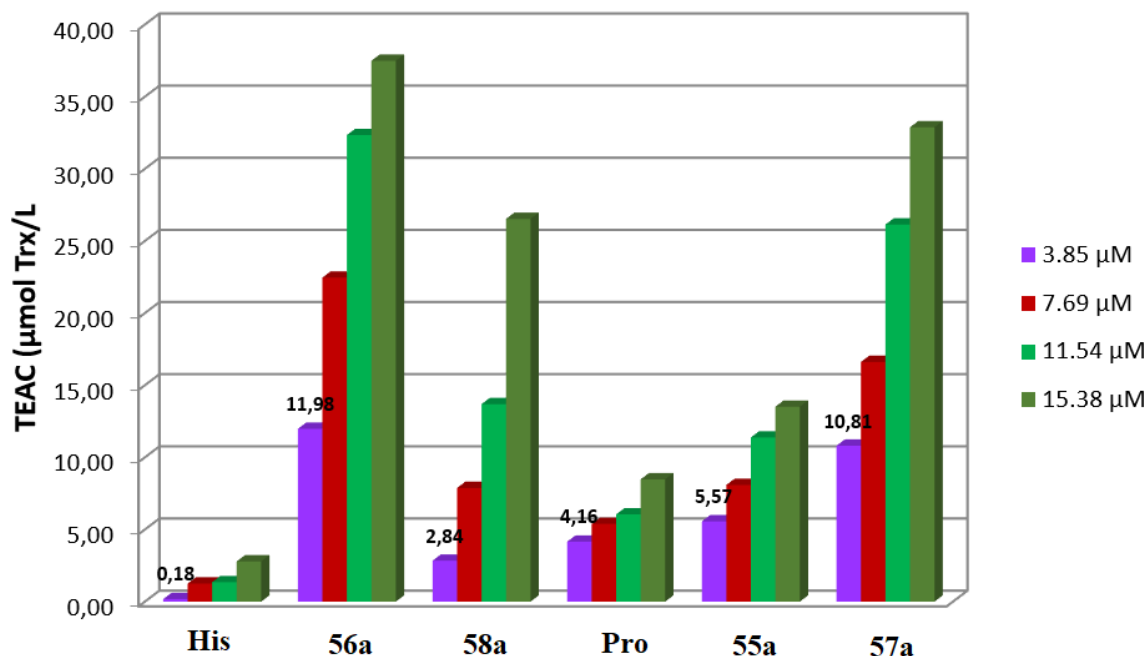
Poniżej przedstawiono wyniki uzyskane po wykonaniu testów dla wybranych związków oraz dla porównania czystych aminokwasów proliny i histydyny.

FRAP



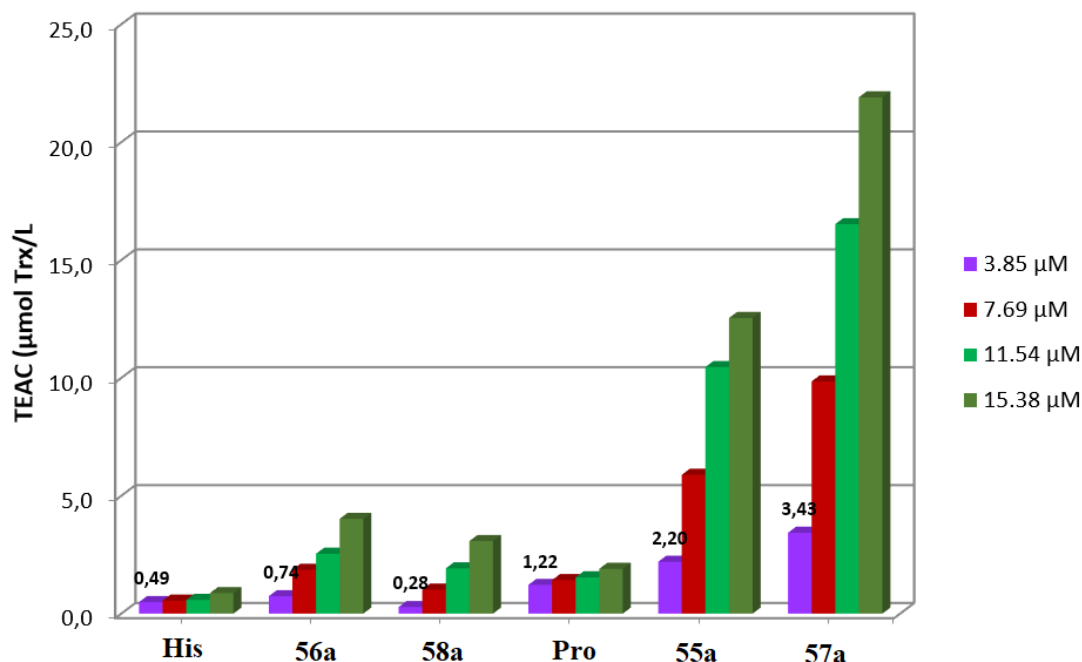
Rys. 40. Wyniki aktywności antyoksydacyjnej (TEAC) polifunkcyjnych dendrymerów wykonanych według metody FRAP (Ferric reducing antioxidant power) w porównaniu do aminokwasów histydyny (His) i proliny (Pro).

CUPRAC



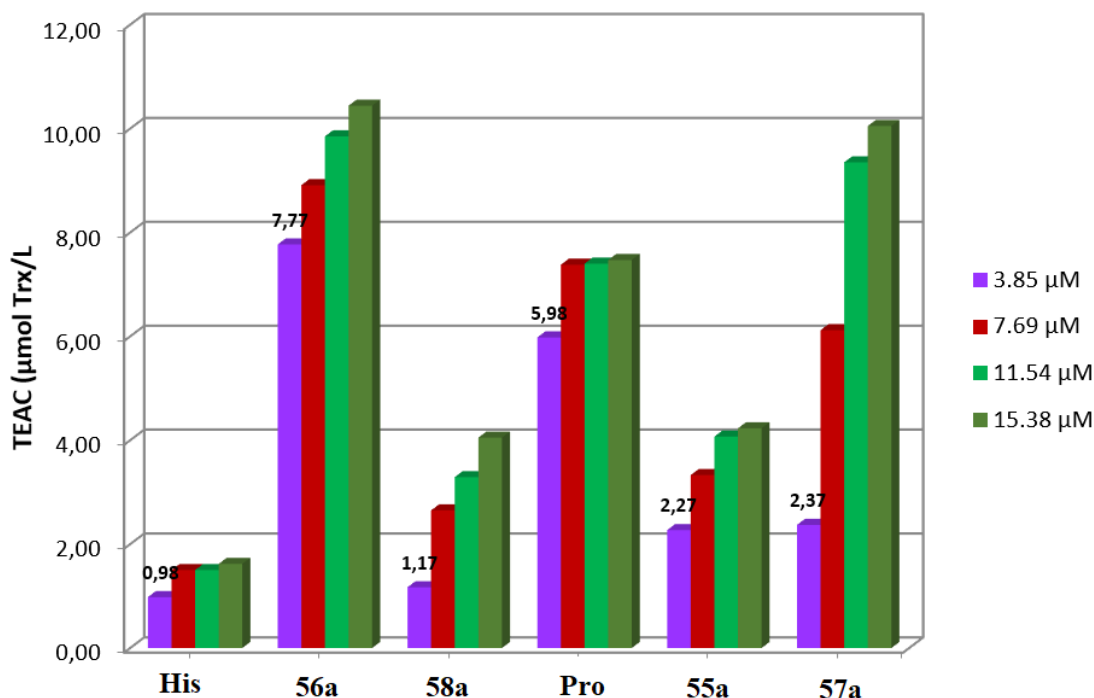
Rys. 41. Wyniki aktywności antyoksydacyjnej (TEAC) polifunkcyjnych dendrymerów wykonanych metodą CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) w porównaniu do histydyny (His) i proliny (Pro).

ABTS



Rys. 42. Wyniki zdolności wyłapywania kationowych wolnych rodników wykonanych metodą ABTS (Radical scavenging assay) polifunkcyjnych dendrymerów w porównaniu do histydyny (His) i proliny (Pro) [TEAC].

DPPH



Rys. 43. Wyniki aktywności przeciwutleniającej (TEAC) dendrymerów wykonanych metodą DPPH (Total free radical scavenging assay) polifunkcyjnych dendrymerów w porównaniu do aminokwasów histydyny (His) i proliny (Pro).

Jak widać z przedstawionych wykresów (Rys. 40 - 43), wartości TEAC zależą od stężenia, struktury łącznika i rodzaju aminokwasu znajdującego się na końcu gałęzi dendrymeru „bola”. Należy również zauważyć, że dendrymery mają znacznie wyższe właściwości antyoksydacyjne w porównaniu z czystymi aminokwasami. Dendrymery „bola” zawierające w pozycjach terminalnych histydynę charakteryzuje wyjątkowo wysoka zdolność do redukcji (FRAP i CUPRAC). Natomiast pochodne z proliną są lepszymi wygaszaczami wolnych rodników. Wybrane terminalne aminokwasy tzn. prolina i histydyna w połączeniu ze specyficzną rozgałęzioną strukturą dendrymerów „bola” nadają związkom silne własności redukujące i zdolność do wyłapywania rodników tlenowych. Nie bez znaczenia pozostaje także charakter aminokwasów znajdujących się na obrzeżach, w przypadku histydyny ważną rolę odgrywa aromatyczny pierścień imidazolowy, który prawdopodobnie zapewnia wysoką zdolność do redukcji jonów (Fe^{3+} lub Cu^{2+}), natomiast w przypadku proliny będącej drugorzędowym aminokwasem znaczącą rolę odgrywa pięcioczłonowy pierścień pirolidynowy nadający zdolność do wygaszania wolnych rodników. Porównując sfunkcjonalizowane dendrymery można również zauważyć, iż wartości TEAC w przypadku dendrymerów prolinowych są wyższe gdy w strukturze występują wiązania estrowe łącznik-dendron w przeciwieństwie do dendrymerów histydynowych w których wartości TEAC są wysokie jeśli w strukturze występują wiązania amidowe łącznik-dendron.

Powyższe wyniki dotyczące zarówno sposobu syntezy dendrymerów „bola” jak i ich właściwości antyoksydacyjnych zostały również ujawnione w zgłoszeniu patentowym P.435269 pt. „Nanocząsteczkowe, peptydowe dendrymery, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowania”, które jest obecnie procedowane w UP RP (data zgłoszenia: 12.09.2020).

3.3 Badanie własności kompleksujących dendrymerów „bola” z lekami onkologicznymi

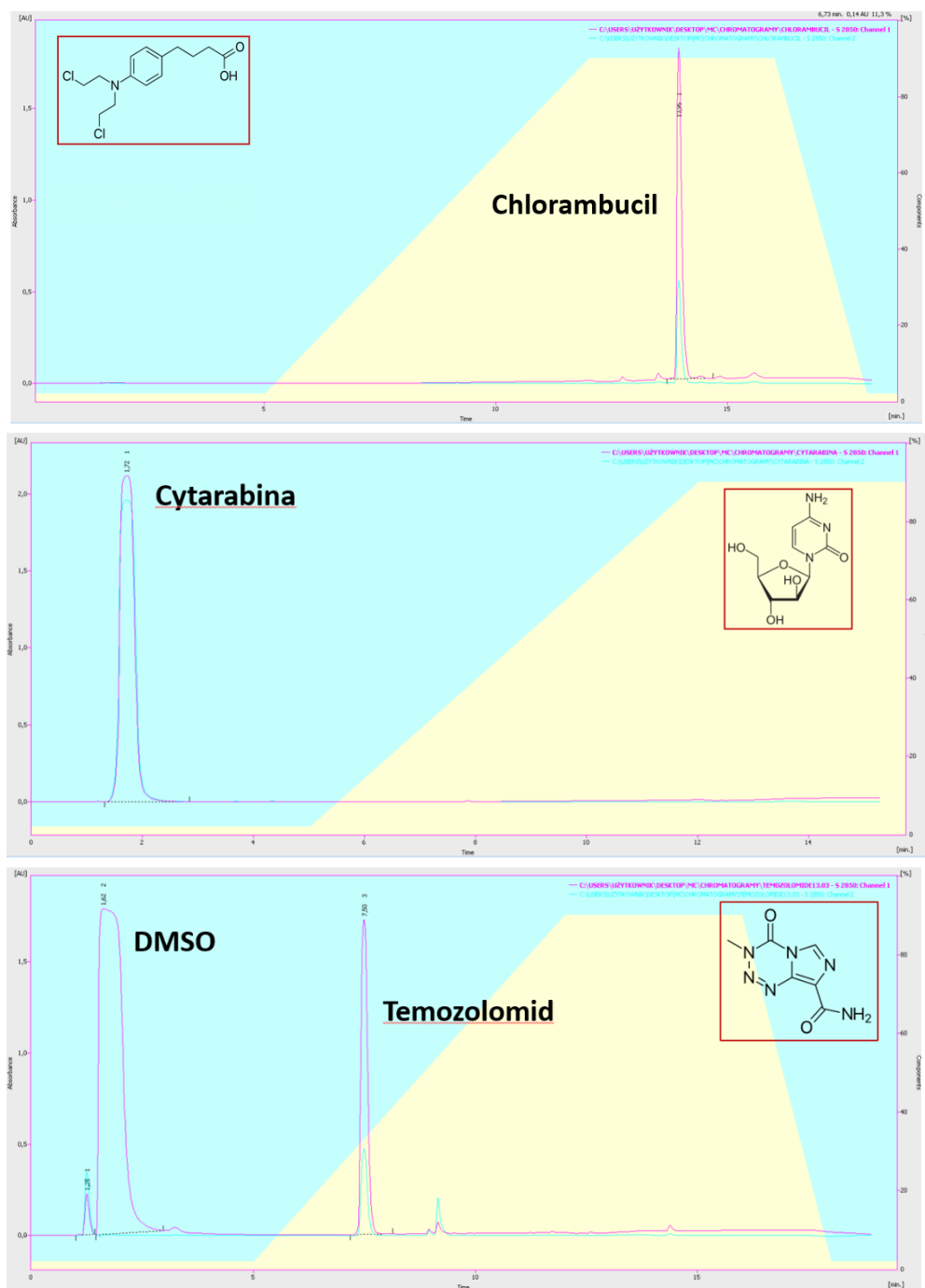
Badania nad zdolnością dendrymerów „bola” do kompleksowania cząsteczek leków stosowanych w terapii onkologicznej, takich jak temozolomid, chlorambucil i cytarabina prowadzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC.) Zastosowano kolumnę analityczną Luna LC-Column, C-8(2)) 150 _ 46 mm firmy Bionacom LTD o wielkości ziarna $3\mu\text{m}$ i wielkości porów 100\AA ,

Na rysunkach 44-47 pokazano czasy wypływu z kolumny czystych leków, czystych dendrymerów „bola” oraz mieszanin dendrymer/lek w stosunku molowym 1:20. Zarówno dendrymery jak i chlorambucil i cytarabina w takich ilościach rozpuszczały się w MeOH.

Najbardziej dla mnie interesujący bo stosowany w terapii glejaka temozolomid (TMZ) rozpuszczał się w MeOH bardzo słabo i zastosowałem DMSO jako rozpuszczalnik.

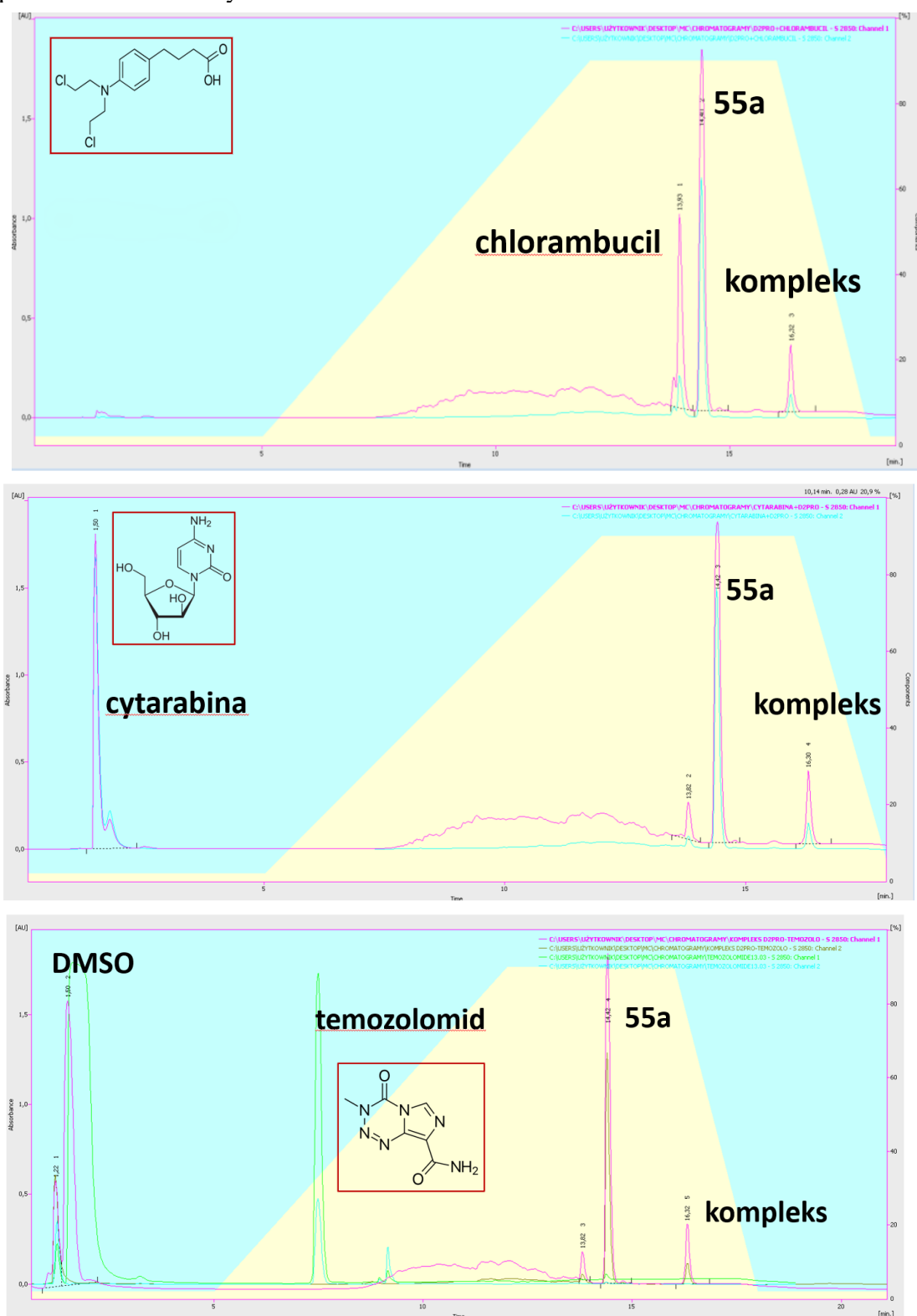
Przedstawione tutaj wyniki zostały ujawnione w zgłoszeniu patentowym P.435269 pt. „Nanocząsteczkowe, peptydowe dendrymery, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowania”, które jest obecnie procedowane w UP RP (data zgłoszenia: 12.09.2020).

Wyniki badań metodą HPLC, tzn. wydłużenie czasu retencji dendrymeru na skutek utworzenia niekowalencyjnego kompleksu z cząsteczką leku przedstawiają Rys. 45-47.



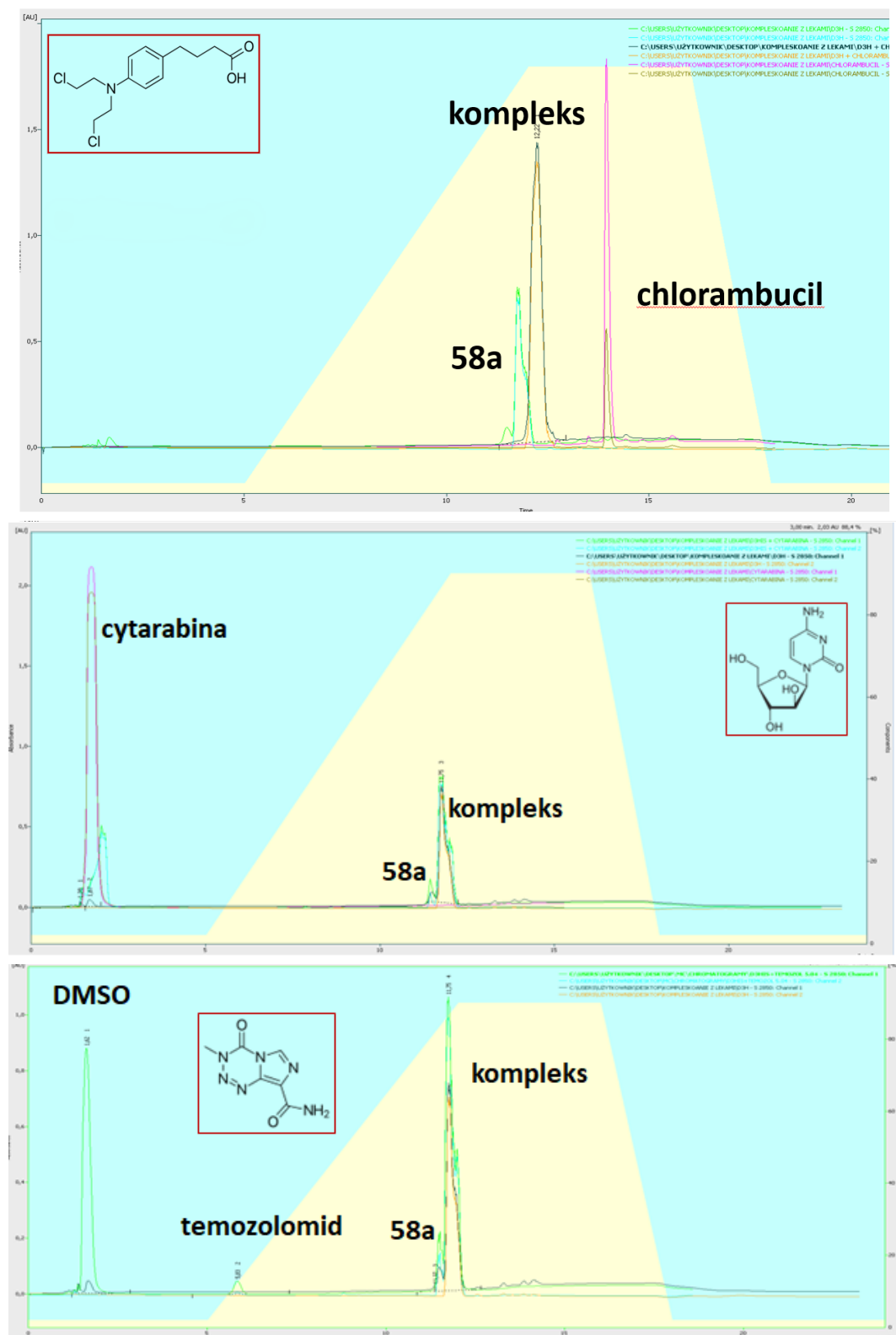
Rys. 44. Widma HPLC leków przeciwnowotworowych.

Poniżej przedstawiono widma HPLC związku **55a** w obecności leków przeciwnowotworowych.



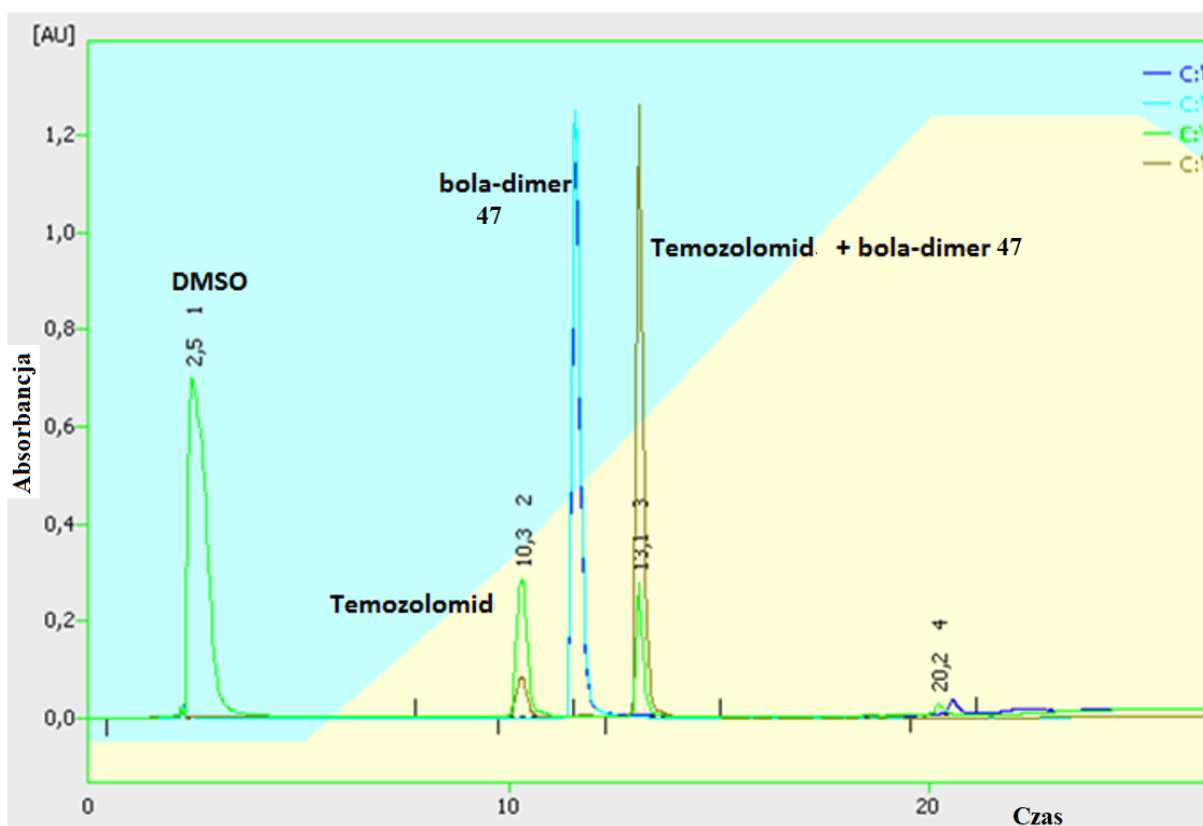
Rys. 45. Widma HPLC mieszaniny dendrymeru **55a** z cząsteczkami leków w stosunku molowym 1:20 (dendrymer:lek). Cząsteczka dendrymeru zawiera cztery terminalne reszty Pro, łącznik amidowy i jest obojętna.

Poniżej przedstawiono widma HPLC związku **58a** w obecności leków przeciwnowotworowych.



Rys. 46. Widma HPLC mieszaniny dendrymeru **58a** z cząsteczkami leków w stosunku molowym 1:20 (dendrymer:lek). Cząsteczka dendrymeru zawiera cztery terminalne reszty His i jest solą z 8 cząsteczkami HCl.

Poniżej przedstawiono widmo HPLC związku **47** w obecności temozolomidu.



Rys. 47. Widmo HPLC wskazujące na utworzenie niekowalencyjnego kompleksu związku **47** z cząsteczką leku.

Cząsteczki leków wybrano tak aby różniły się ilością i charakterem chemicznym grup protono-donorowych i protono-akceptorowych. Wybrane do tego eksperymentu dendrymery „bola” to **55a** z łącznikiem amidowym i posiadający cztery terminalne proliny oraz dendrymer **58a** z łącznikiem estrowym i posiadający cztery terminalne reszty histydyny. Dla porównania pokazano wyniki eksperymentu dla dendrymeru **47** z łącznikiem amidowym, którego struktura dendronu oparta jest nie na ornitynie ale na bardziej giętkiej lizynie.

Interesujące jest, że w tych eksperymentach neutralny dendrymer **55a** tworzył kompleksy z cząsteczkami wszystkich leków, bez względu na ich budowę chemiczną i możliwość tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych. Natomiast kationowy dendrymer **58a** tworzył wyraźny kompleks głównie z chlorambucilem posiadającym grupę karboksylową.

W Zespole prof. Czyża w Zakładzie Biologii Komórki na Uniwersytecie Jagiellońskim. podjęto także badania nad wpływem mieszanin dendrymerów z temozolomidem (TMZ) o wzrastającym stężeniu na pojawienie się procesu apoptozy komórek glejaka T98G. Wstępne wyniki pokazują, że 45 min. po zmieszananiu dendrymeru z 10 mikroM TMZ apoptoza prawie się nie pojawia. Mieszanina 50:50 i 50:100 mikroM (dendrymer:TMZ) indukuje znaczący efekt

pro-apoptotyczny. Co ciekawsze, bole w stężeniu 50 μM w 5 przypadkach dają silniejszy efekt, niż „czysty” TMZ. Tylko w przypadku **57a** i w **58a** widać pewien efekt addytywny, w pozostałych przypadkach TMZ obniża aktywność związków. Podanie odpowiednich mieszanin natychmiast po zmieszaniu nie daje takich efektów w komórkach glejaka, co mogłoby oznaczać, że potrzebny jest czas na utworzenie kompleksu. Badania te ze względu na śmierć dr Damiana Ryszawego nie były kontynuowane.

3.4 Badanie oddziaływań dendronów sfunkcjonalizowanych resztami polifenoli aromatycznych z drugorzędowymi strukturami tworzonymi przez kwas poli-L-glutaminowy i poli-L-lizynę

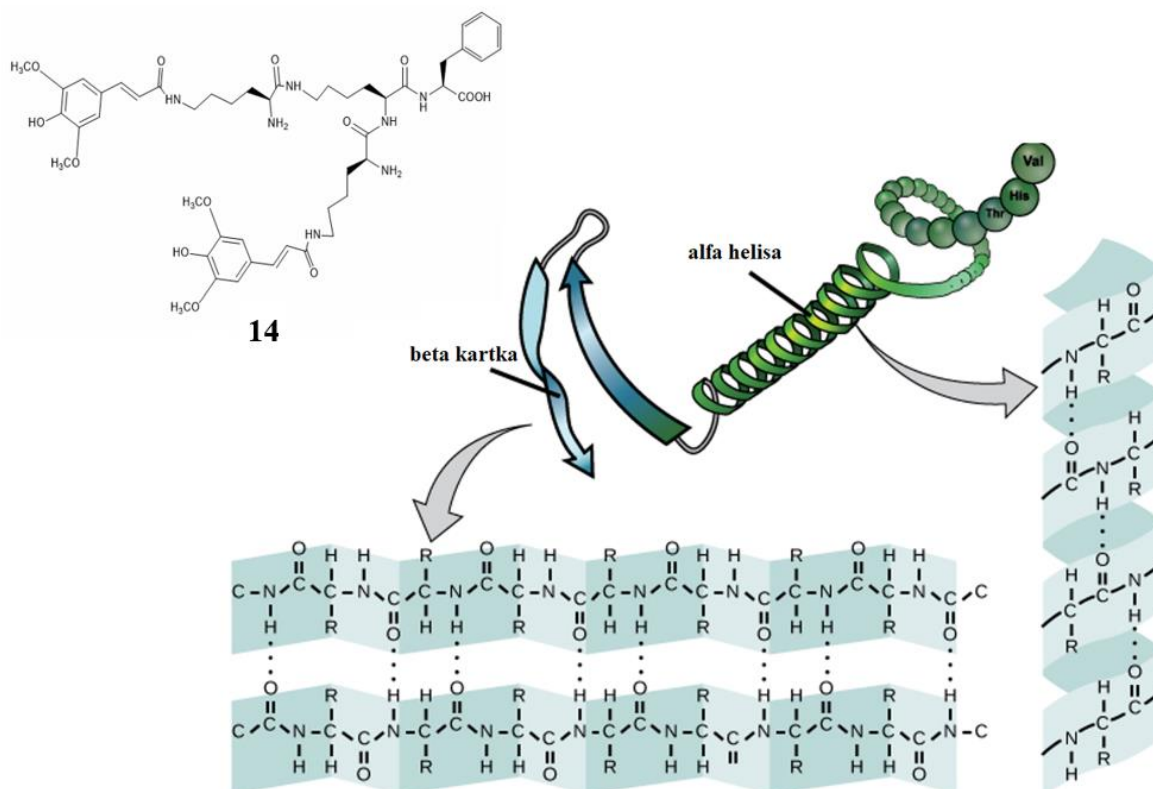
Medycyna w chwili obecnej nie posiada nowoczesnych leków przydatnych do leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Głównie dlatego, że nie do końca poznane są przyczyny które inicjują takie procesy chorobowe. Ogólnie akceptowanym i potwierdzonym eksperymentalnie faktem jest występowanie w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera, Parkinsona itp., złogów (samoistnie powstających agregatów peptydów takich jak β -amyloid lub białek), które upośledzają funkcjonowanie komórek nerwowych i ewentualnie powodują ich obumarcie. Według przyjętego mechanizmu, niekorzystną agregację odpowiednich monomerów inicjują wielokrotne oddziaływania pomiędzy grupami amidowymi, wspomagane oddziaływaniami pomiędzy resztami aminokwasów o hydrofobowych łańcuchach bocznych. Procesy takie prowadzą do utworzenia struktury β -kartki i w wyniku następczej agregacji do powstania nierozpuszczalnych depozytów. Jednym z obecnych trendów w badaniach nad poszukiwaniem nowoczesnych leków jest projektowanie związków, które potrafią zdegradować powstałe agregaty do form rozpuszczalnych w cytoplazmie.

Jedną z grup związków proponowanych do takich zastosowań są polifunkcyjne dendrymery, np. dendrymery PAMAM [119]. Pomimo, że związki te działają destrukcyjnie wobec struktur β -amyloidowych to jednak same cząsteczki ze względu na ich polikationową strukturę są bardzo toksyczne dla zdrowych komórek.

Otrzymane przeze mnie niewielkie dendrony sfunkcjonalizowane resztami polifenoli aromatycznych mogłyby pełnić podobną rolę ponieważ są nietoksyczne i mają polifunkcyjną amfifilową strukturę. W dodatku, obecność grup hydroksylowych i sprotonowanych grup aminowych stwarza duże możliwości dla tworzenia z agregatami β -amyloidu oddziaływań typu jonowego oraz tworzenia wiązań wodorowych. Dlatego postanowiłem zbadać oddziaływanie związku **14**, sfunkcjonalizowanego kwasem synapinowym ze strukturami drugorzędowymi

tworzonymi przez modelowe polipeptydy - anionowy kwas poli-L-glutaminowy i kationową poli-L-lizynę.

W tym celu zastosowano spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), w której badano ewolucję charakterystycznych pasm związanych ze strukturą drugorzędową pasm w funkcji stężenia dendronu (Rys. 48). Względny udział α -helisy, β -kartki, " β -skrętu" i "innych" struktur drugorzędowych oszacowano przy użyciu algorytmu dekonwolucji z programu BeStSel. [126]



Rys. 48. Związek **14** oraz struktury II-rzędowe α -helisy i β -kartki.

W przypadku struktury α generowanej z PLL lub PLGA przy stężeniu dendronu **14** wynoszącym 266 μ M obserwowano zmniejszenie zawartości formy β -kartki do 11%, przy jednoczesnym wzroście zawartości β -skrętu do \sim 32%. Może to sugerować, że po interakcji z amfifilowym związkiem **14** albo dłuższe łańcuchy PLL ulegają wygięciu, albo dendron **14** łączy się z C-końcowymi fragmentami dwóch α -helis poprzez tworzenie licznych wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych.

W przypadku struktury β zaobserwowano pewien (niewielki) wpływ dendronu **14** na strukturę β -kartki jeśli chodzi o zmniejszenie intensywności pasma i przesunięcia pozycji tego pasma, a także stwierdzono zmniejszenie zawartości β -kartki na korzyść α -helisy oraz znaczny wzrost zawartości struktur określanych jako "inne" (do 52%-59%).

Dendron **14** w wyższym stężeniu zmieniał kształt, intensywność i strukturę widma CD w sposób zależny od stężenia. Przy 75 μM , widmo CD miało kształt szerokiego plateau i dyskretną strukturę o intensywności zbliżającej się do zera. Zmniejszenie skreconych β struktur i większy odsetek zrelaksowanej formy β -karki może sugerować stabilizujący wpływ związku **14**.

W wyniku badań obserwowano zmiany struktur drugorzędowych modelowych polipeptydów PLL i PLGA w sposób zależny od struktury i stężenia, związek **14** wydaje się wykazywać korzystne zdolności do rozplątywania struktury β -karki co można by wykorzystać do zapobiegania tworzeniu się nierozpuszczalnych agregatów. Jednakże potrzebne byłyby dalsze i szczegółowe badania w tym zakresie.

Powyższe badania zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Mają Morawiak w Instytucie Chemii Organicznej PAN, a omawiane wyniki zostały szczegółowo przedstawione w publikacji M. Morawiak i wsp. „Interactions of rationally designed small peptide dendrons functionalized with valine or sinapic acid with α -helix and β -sheet structures of poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid”, Pept Sci. 2020;e24155. [123]

3.5 Badania biologiczne - aktywność przeciwnowotworowa uzyskanych związków

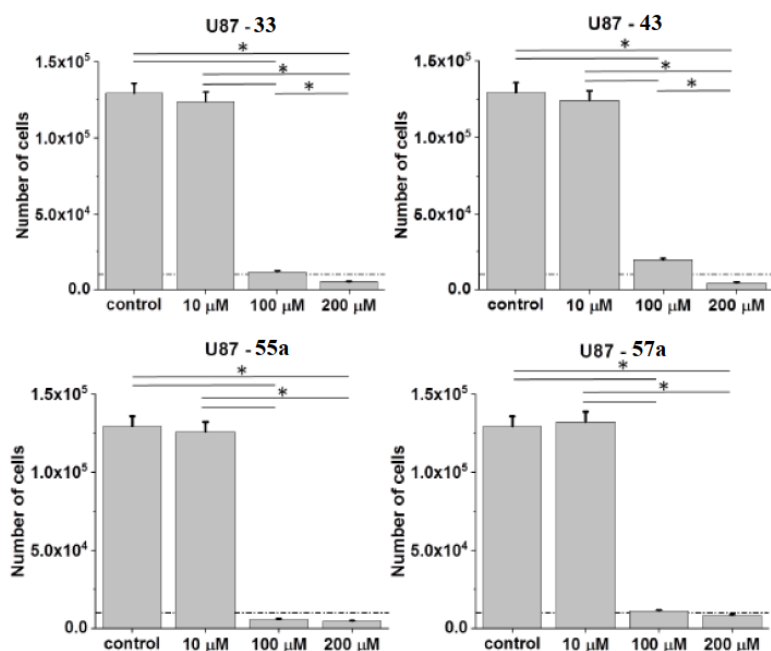
Badanie biologiczne dendronów oraz dendrymerów zostały przeprowadzone w Zespole prof. Czyża w Zakładzie Biologii Komórki na Uniwersytecie Jagiellońskim.

Aktywność cytostatyczna i proapoptotyczna uzyskanych dendronów/dendrymerów decyduje o ich potencjale antynowotworowym.

Aby określić zależności między strukturą a bioaktywnością dendronów/dendrymerów związki poddano badaniu w modelu komórek glejaka U87 testując ich działanie cytostatyczne.

Dendrony z proliną i arginina oraz dendrymery „bola” z proliną w modelu glejaka in vitro

Podczas badań zaobserwowano stosunkowo silny efekt hamujący dla (+)4 naładowanego dendronu **33** (dendron z arginina) na proliferację komórek U87, mimo że jego aktywność była widoczna tylko w stężeniach 100 i 200 μM . (Rys. 49)



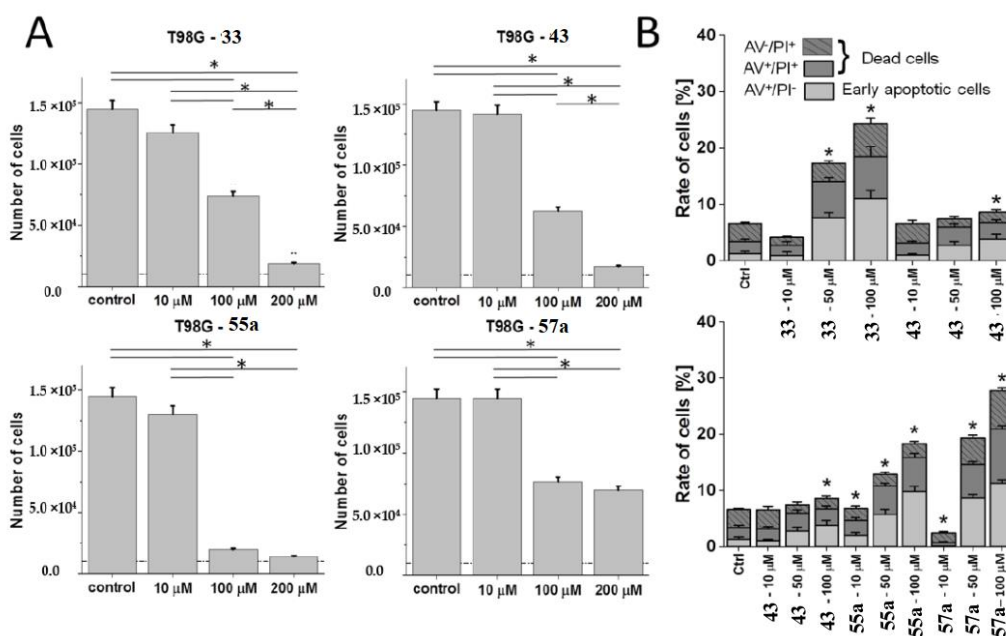
Rys. 49. Efekty cytostatyczne kationowego dendronu **33**, neutralnego dendronu **43** oraz funkcjonalizowanych proliną dendrymerów „bola” **55a** i **57a** na populację komórek U87. [125]

Substytucja proliną oraz neutralny charakter dendronu **43** osłabiały jego aktywność cytostatyczną, jak widać na rys. 49 znaczna aktywność dendronu **43** była widoczna tylko w stężeniu 200 μM . Z kolei funkcjonalizowany proliną dendrymer **55a** połączony z łącznikiem poprzez wiązania amidowe wykazywał najwyższą aktywność cytostatyczną w stężeniu 100 μM , wyższą niż oba monomery – dendrony **33** i **43**. Natomiast połączenie tego samego dendronu **43** z łącznikiem poprzez biodegradowalne wiązania estrowe, jak w dendrymerze „bola” **57a** obniżało jego aktywność.

Dane te sugerują, że dimeryzacja dendronu może zwiększać jego bioaktywność, podczas gdy ładunek molekularny oraz szczególna struktura chemiczna modulują ten efekt.

W kolejnym etapie przeprowadzono także badania porównawcze aktywności cytostatycznej i proapoptotycznej dendronów/dendrymerów w alternatywnym modelu komórkowym T98G wykazującym wyższą wewnętrzną heterogeniczność. Tutaj także dendrony **33** i **43** oraz dendrymery sfunkcjonalizowane proliną **55a** i **57a** wykazywały zależną od stężenia cytotoksyczność (Rys. 50).

Dendrymer **57a** był najbardziej wrażliwy na różnice fenotypowe pomiędzy tymi dwoma liniami komórkowymi, co ilustruje stosunkowo wysoka liczba komórek T98G nawet przy stężeniu 200 μM . W stężeniu 10 μM najlepsze właściwości cytostatyczne i anty-apoptotyczne wykazywał dendron **33**, z kolei w stężeniach 100 i 200 μM najwyższą aktywność wykazywał dendrymer **55a**. (Rys. 50)



Rys. 50. Efekty cytostatyczne i anty-apoptotyczne kationowego dendronu **33**, neutralnego dendronu **43** oraz funkcjonalizowanych proliną dendrymerów „bola” **55a** i **57a** na populację komórek T98G. [125]

Do określenia charakterystyki śmierci komórek użyto testu FITC-Annexin V/bromek etydyny w czasie rzeczywistym. Stosowano stężenie 50 μM , aby dokładniej określić stężenia związków, które powodują znaczącą odpowiedź apoptotyczną komórek. Jak można zauważyć na rys. 50 dendron **33** wywierał wyraźniejszy efekt apoptotyczny niż dendron **43** w modelu T98G przy braku znaczących różnic w ogólnej aktywności cytostatycznej.

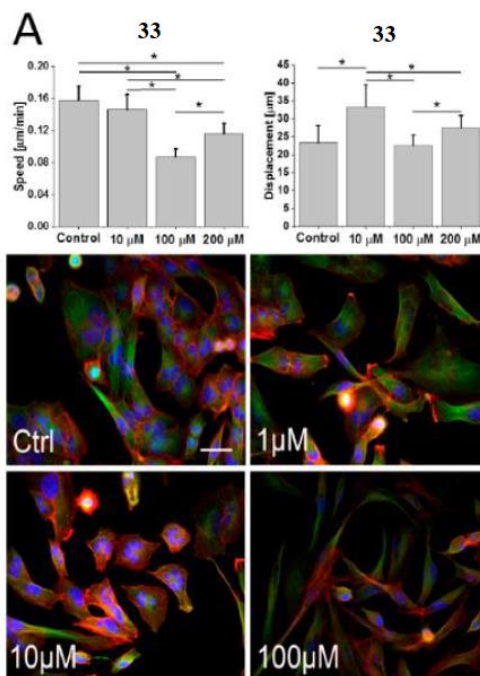
Dimeryzacja dendronu **43** do dendrymeru „bola” **55a** zwiększa zarówno aktywność pro-apoptotyczną, jak i cytostatyczną związków. Co ciekawe, gdy łącznik połączony jest z dendrymerem poprzez biodegradowalne wiązania estrowe (**związek 57a**) obserwowano obniżenie efektu cytostatycznego, ale nie obserwowano zmian aktywności pro-apoptotycznej.

Dane te mogą być wyjaśnione w kategoriach heterogenności populacji T98G, co może leżeć u podstaw ich wrażliwości na te związki. Silne odpowiedzi apoptotyczne wysoce wrażliwej subpopulacji T98G mogą być kompensowane przez niższą wrażliwość innych subpopulacji T98G na dany związek.

Wpływ dendronów z proliną i arginina oraz dendrymerów „bola” z proliną na potencjał inwazyjny i morfologię komórek T98G

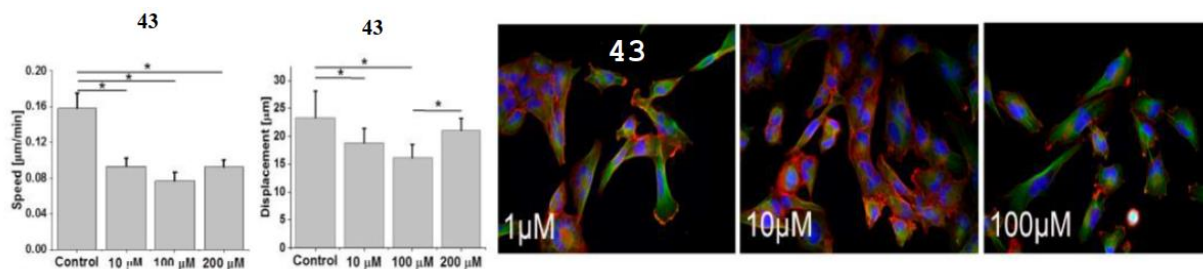
W celu określenia, w jaki sposób struktura chemiczna dendronów wpływa na inwazyjność heterogennych fenotypowo komórek glejaka, przeprowadzono ocenę morfologii i ruchliwości komórek T98G poddanych działaniu dendronów **33** i **43**.

W przypadku dendronu **33** obserwowano nieistotny hamujący wpływ na ruchliwość komórek T98G oraz silny wpływ na morfologię komórek T98G, co ilustruje ich przesunięcie w kierunku morfologii wrzecionowatej w komórkach T98G w obecności 100 μM związku **33** (Rys. 51).



Rys. 51. Wpływ związku **33** (1-200 μM) na potencjał inwazyjny i morfologię komórek T98G.[125]

Mniej wyraźne zmiany morfologii i stosunkowo nieistotne zahamowanie ruchliwości T98G obserwowano w obecności dendronu **43** (Rys. 52).

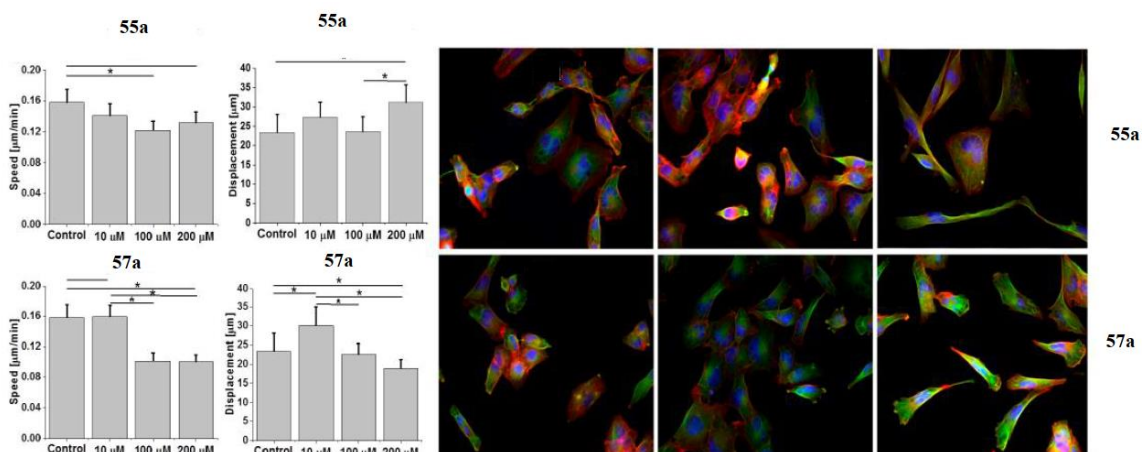


Rys. 52. Wpływ związku **43** na potencjał inwazyjny i morfologię komórek T98G.[125]

Co ciekawe, wpływ sfunkcjonalizowanych proliną dendrymerów „bola” **55a** i **57a** na ruchliwość T98G prawie nie korelował z ich aktywnością cytostatyczną/pro-apoptotyczną. W przypadku dendrymeru **57a** obserwowano nieznaczny wpływ na proliferację i morfologię T98G przy ogólnie niższej ruchliwości T98G w warunkach stresu w obecności 100 µM **57a**. (Rys. 53).

Z kolei stosunkowo wysoka aktywność cytostatyczna **55a** korelowała ze zwiększoną szybkością przemieszczania się komórek T98G poddanych działaniu związku **55a** i ich wrzecionowatą/tylną spolaryzowaną morfologią pod wpływem stresu w obecności 100 µM **55a** (Rys. 53).

Dane te potwierdzają, że funkcjonalizowane proliną, ale strukturalnie odmienne dendrony/dendrymery wywołują dyskretny wzór fenotypowej mikroewolucji/selektywnej ekspansji komórek lekoopornych/inwazyjnych w heterogennych populacjach glejaka. Przeciwnastawne efekty heterogennej chemiooporności T98G i cytotoksyczności dendronów/dendrymerów mogą przyczyniać się do mniejszej bioaktywności dendronów/dendrymerów w systemie T98G.

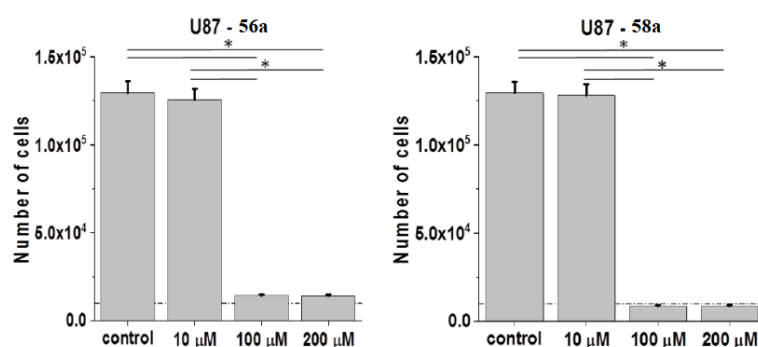


Rys. 53. Wpływ związków **55a** i **57a** na potencjał inwazyjny i morfologię komórek T98G.[125]

Dendrony z histydyną oraz dendrymery „bola” z histydyną w modelu glejaka in vitro

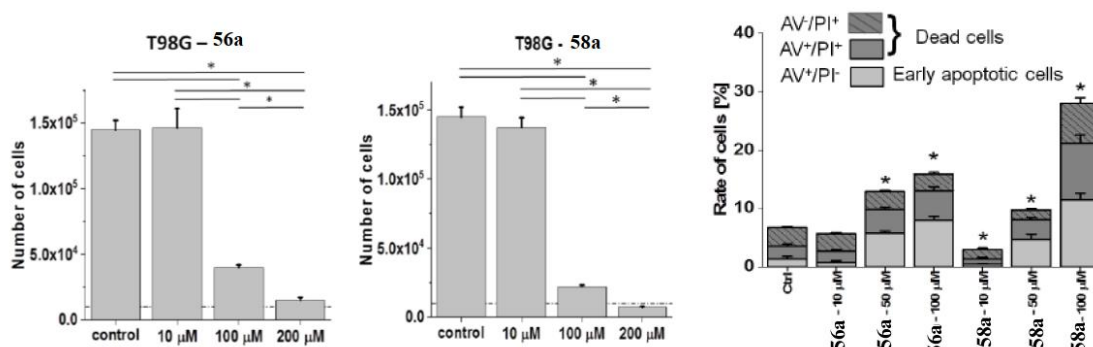
W przeciwieństwie do nienaładowanych, zakończonych proliną dimerów **55a** i **57a**, funkcjonalizowane histydyną dendrymery „bola” **56a** i **58a** są (+8)-naładowane i amfifilowe. Badania dendrymeru **56a** w modelu glejaka U87 wykazały jego aktywność cytostatyczną, która była podobna do tej, jaką wykazuje dendrymer **55a**.

W przypadku dendrymeru **58a** zaobserwowano nieco większą wrażliwość komórek U87 na **58a** niż na **57a**. Co ważne, aktywność **58a** była również wyższa niż **56a**, co wskazuje na znaczną rolę kombinacji wiązań estrowych/właściwości amfifilowych dla aktywności dendronów/dendrymerów (Rys. 54).



Rys. 54. Efekty cytostatyczne funkcjonalizowanych histydyną dendrymerów „bola” **56a** i **58a** na populację komórek U87. [125]

Stosunkowo wysoką bioaktywność **58a** w porównaniu z **56a** zaobserwowano również w bardziej opornym modelu T98G, co przedstawia Rys. 55. W stężeniu 10 μM, 100 μM oraz 200 μM związek **58a** ma wyższą aktywność proapoptotyczną.

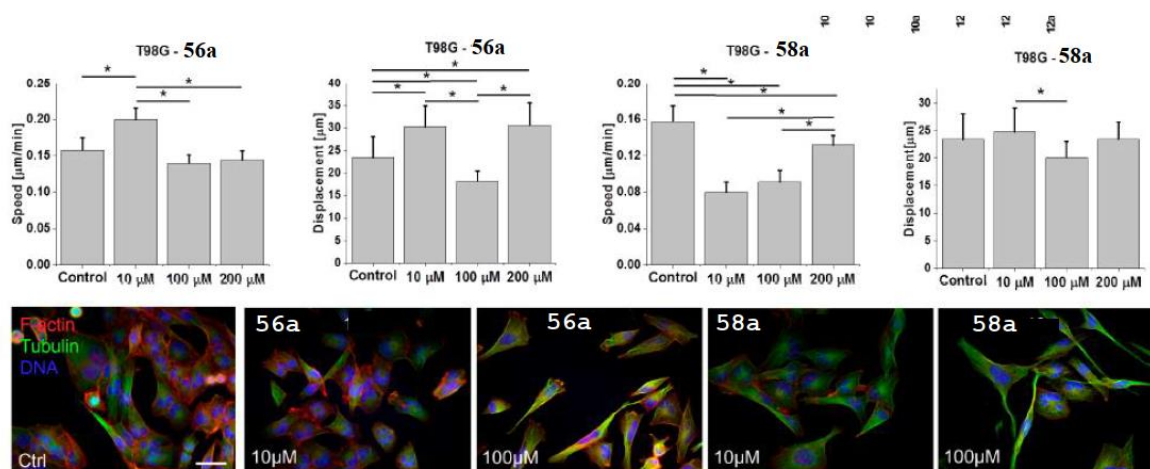


Rys. 55. Efekty cytostatyczne i anty-apoptotyczne funkcjonalizowanych histydyną dendrymerów „bola” **56a** i **58a** na populację komórek T98G. [125]

Dla związków **56a** i **58a** stwierdzono brak korelacji pomiędzy dawką (stężeniem) podawanego związku a szybkością przemieszczania się komórek T98G.

W parze dendrymerów gdzie łącznik połączony jest z dendrymerem poprzez biodegradowalne wiązania estrowe (**57a** i **58a**) reszty histydynowe wyraźnie wzmocniły antyproliferacyjną i antyinwazyjną aktywność **58a** w modelu T98G, mimo że związek **57a** zakończony proliną wykazywał podobną aktywność proapoptotyczną co związek **58a** zakończony His (Rys. 56).

W obecności 10 μM związku **58a** zmniejszonej proliferacji komórek T98G towarzyszyła także zmniejszona ruchliwość (szybkość). W przeciwieństwie do **57a** związek **58a** zwiększał ruchliwość komórek T98G i frakcję wrzecionowatych komórek T98G gdy zastosowano 200 μM związku (Rys. 56). Dowodzi to, że frakcja wysoce ruchliwych komórek T98G może wykazywać zwiększoną oporność na oba związki.

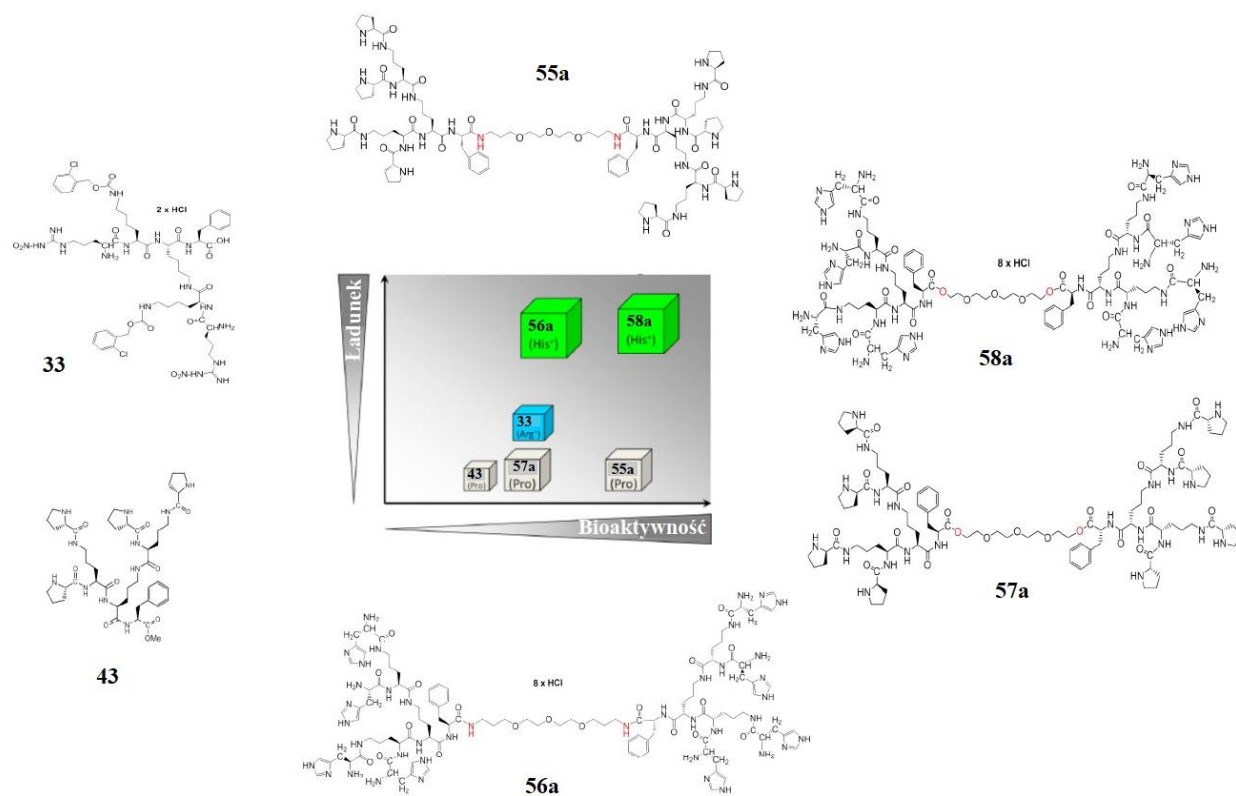


Rys. 56. Wpływ związków **56a** i **58a** na potencjał inwazyjny i morfologię komórek T98G.[125]

Dwa dendrymery „bola” o odmiennej budowie chemicznej i różnych obrzeżach, ale o podobnej aktywności cytostatycznej **55a** i **58a** wywołały wzrost aktywności ruchowej komórek T98G, której towarzyszyła zwiększona frakcja komórek wrzecionowatych. Uzyskane dane i wyniki wskazują, że podstawienie dendrymeru histydyną, która nadaje mu amfifilowości oraz zapewnia ładunek dodatni może zwiększyć bioaktywność dendrymerów.

Należy mieć jednak na uwadze, iż efekt ten może być niszczonej przez heterogenność komórkową i mikroewolucję lekoopornych populacji glejaka.

Podsumowując przeprowadzone badania należy stwierdzić, iż struktura oraz charakter związku mają zasadnicze znaczenie w przypadku aktywności biologicznej. Ponadto dimeryzacja dendronu zwiększa bioaktywność tak uzyskanego dendrymeru typu „bola”, a ładunek molekularny oraz struktura chemiczna dodatkowo modulują ten efekt. (Rys. 57).



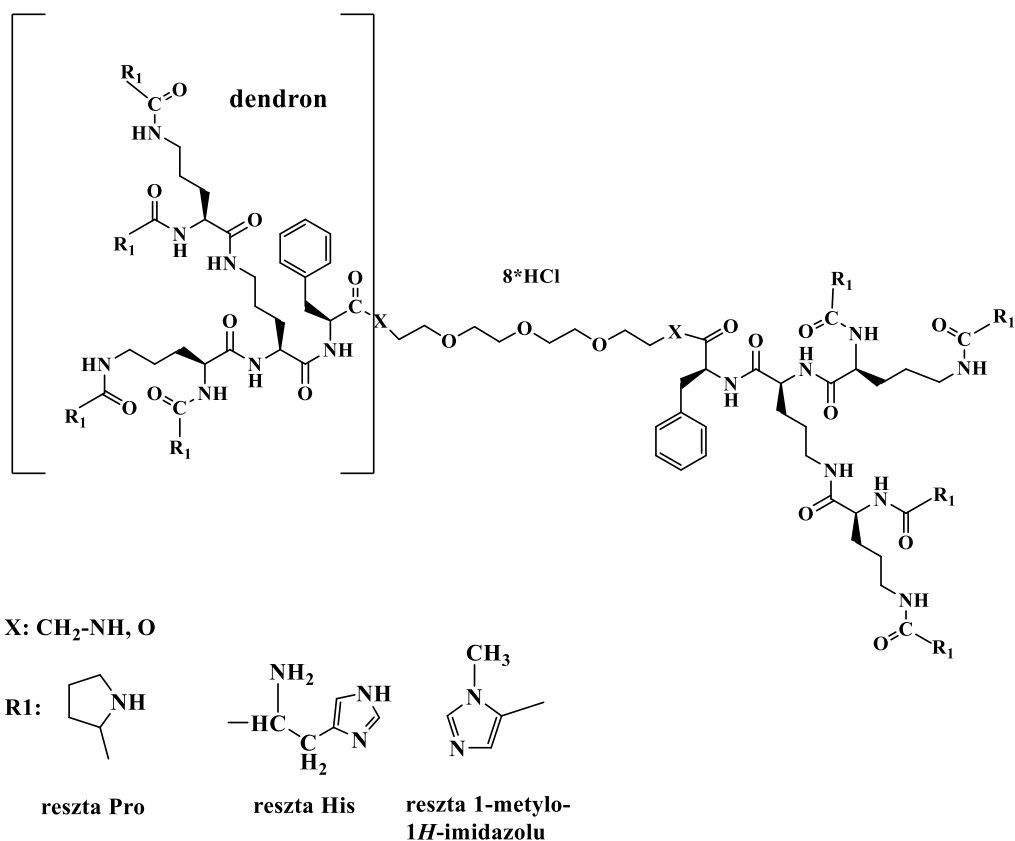
Rys. 57. Diagram przedstawiający zależności pomiędzy strukturą i ładunkiem wybranych związków a ich bioaktywnością. [125]

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem przedłożonej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i opracowanie strategii syntezy nanocząsteczkowych peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola” klasyczną metodą w roztworze bądź na nośniku stałym oraz zbadanie struktury i właściwości uzyskanych związków, a także ich wpływu na zdrowe i chorobowo zmienione komórki układu nerwowego. Cel ten został w pełni zrealizowany.

Realizując niniejszą pracę zaplanowałem i zsyntezowałem w pierwszej kolejności grupę dendronów peptydowych (na bazie lizyny lub ornityny) oraz dendronów sfunkcjonalizowanych pochodnymi kwasu cyjanonowego lub pochodnymi imidazolu. Reakcje przeprowadziłem zarówno metodą syntezy w roztworze jak i na nośniku stałym dzięki czemu opracowałem optymalne warunki syntezy dla poszczególnych dendronów. Ponadto, uzyskane wyniki i dane umożliwiły na przeprowadzenie analizy porównawczej obu metod syntetycznych oraz ocenę wpływu ścieżki syntetycznej na wydajności reakcji. Reakcję w roztworze prowadziłem metodą karbodiimidową techniką „step by step” kontrolując przebieg reakcji pośrednich poprzez wyodrębnianie i oczyszczanie związków pośrednich, co znacznie wydłuża całkowity czas syntezy, ale finalnie pozwala na uzyskanie czystych związków w dużych ilościach. Natomiast w przypadku syntez dendronów na nośniku stałym czas reakcji jest krótszy, nie wydziela się produktów pośrednich, lecz całkowita wydajność reakcji jest niższa.

W drugiej części badań zaplanowałem i opracowałem sposób syntezy peptydowych dendrymerów typu „bola” posiadających w swojej strukturze trwałe jak i degradowalne łączniki organiczne o ogólnej strukturze pokazanej poniżej:



Syntezy poszczególnych dendrymerów prowadziłem w roztworze metodą karbodiimidową, a badania eksperymentalne doprowadziły do opracowania właściwej metodologii wytwarzania związków tej grupy. Opracowana i zoptymalizowana strategia polega na: 1) otrzymaniu zabezpieczonego dendronu, który w następnym etapie 2) poddaje się reakcji z odpowiednim łącznikiem organicznym, co prowadzi do wytworzenia rdzenia dendrymeru typu „bola”, a uzyskany rdzeń w ostatnim etapie 3) poddaje się funkcjonalizacji prowadzącej do finalnego związku.

Konformację wybranych związków i ewentualną samoagregację w roztworze zbadano metodą dichroizmu kołowego (CD). Uzyskane widma CD sugerują, że dendrymery „bola” istnieją w roztworze MeOH jako mieszanina agregatów o wielu konformacjach. Widma CD wszystkich dendrymerów również zawierają minima w okolicach 200 nm, co może sugerować obecność agregatów o przypadkowej konformacji, przynajmniej w przypadku dendrymerów „bola” zawierających prolinę.

Dla wybranych związków wykonano badania właściwości antyoksydacyjnych. Stwierdzono że, dendrymery „bola” zawierające w pozycjach terminalnych histydynę charakteryzuje wyjątkowo wysoka zdolność do redukcji, natomiast pochodne z proliną są lepszymi wygaszczami wolnych rodników. Stwierdzono występowanie efektu

dendrytycznego, tzn. właściwości antyoksydacyjne dendrymerów bola są wyższe niż suma odpowiednich efektów dla pojedynczego terminalnego aminokwasu. Uzyskane dendrymery „bola” wykazują wyjątkowo silne własności redukujące i zdolność do wyłapywania rodników tlenowych przez co mogą znaleźć zastosowanie jako inhibitory w niekontrolowanych procesach utleniania przyczyniających się do wielu procesów chorobowych czy chociażby jako środki konserwujące w kosmetyce czy przetwórstwie spożywczym.

W wyniku badania własności kompleksujących dendrymerów „bola” z lekami onkologicznymi dowiedziono, iż neutralny dendrymer sfunkcjonalizowany proliną (związek **55a**) tworzy kompleksy z wszystkimi testowanymi cząsteczkami leków (cytarabina, temozolomid, chlorambucil), bez względu na ich budowę chemiczną i możliwość tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych. Natomiast kationowy dendrymer sfunkcjonalizowany histydyną (związek **58a**) tworzy wyraźny kompleks głównie z chlorambucilem posiadającym grupę karboksylową. W badaniach przeprowadzonych w grupie prof. Czyża zaobserwowano, iż dendrymery „bola” w stężeniu 50 μM w 5-ciu przypadkach dają silniejszy efekt, niż „czysty” temozolomid. W przypadku związków zawierających estrowy łącznik **57a** i **58a** widać pewien efekt addytywny.

Przeprowadzone obserwacje i badania oddziaływań dendronów z drugorzędowymi strukturami tworzonymi przez kwas poli-L-glutaminowy i poli-L-lizynę doprowadziły do wniosku, iż modelowy dendron polilizynowy funkcyjonalizowany kwasem synapinowym (związek **14**) wykazuje korzystne zdolności do rozplątywania struktury β -kartki, co można by wykorzystać do zapobiegania tworzeniu się nierozpuszczalnych agregatów i złogów, które upośledzają funkcjonowanie komórek nerwowych i ewentualnie powodują ich obumarcie.

Uzyskane wyniki badań biologicznych sugerują, że dimeryzacja dendronu może zwiększać jego bioaktywność, podczas gdy ładunek molekularny oraz szczególna struktura chemiczna modulują ten efekt. Przeprowadzone badania wykazały, iż w parze dendrymerów gdzie łącznik połączony jest z dendrymerem poprzez biodegradowalne wiązania estrowe (związek **57a** i **58a**) reszty histydynowe wyraźnie wzmocniły antyproliferacyjną i antyinwazyjną aktywność związku **58a** w modelu T98G, mimo że związek **57a** zakończony proliną wykazywał podobną aktywność proapoptotyczną co związek **58a** zakończony His.

Uzyskane dane i wyniki wskazują, że podstawienie dendrymeru histydyną, która nadaje mu amfifilowość oraz zapewnia ładunek dodatni, zwiększa bioaktywność dendrymerów.

W trakcie badań zaobserwowano stosunkowo wysoką bioaktywność związku **58a** w bardziej opornym modelu glejaka T98G.

Ponadto w wyniku badań stwierdzono, że wewnątrzkomórkowa biodostępność związków dendrymerycznych, która w głównej mierze decyduje o ich aktywności przeciwnowotworowej zależy od ich zdolności do penetracji błon komórkowych, co jest bezpośrednio skorelowane z ładunkiem (dodatnim) dendrymerów, ich charakterem amfifilowym i często zależy od ich wielkości (masy cząsteczkowej).

Dotychczas przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że związki będące przedmiotem niniejszej dysertacji stanowią grupę potencjalnych farmaceutyków o korzystnych właściwościach mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób i patologii układu nerwowego. Dendrymery typu „bola” wykazujące właściwości kompleksowania leków onkologicznych mogą działać jako nanocząsteczkowe nośniki dostarczając leki do komórek chorobowo zmienionych i wpisują się znakomicie w założenia współczesnych terapii celowanych oraz przeciwnowotworowych. Jednakże warunkiem dodatkowym może być stabilność kompleksów w warunkach fizjologicznych. Przeprowadzone badania oraz analizy zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną dendrymerów dały wartościowe informacje o kierunkach przyszłych modyfikacji strukturalnych oraz stanowią punkt wyjścia, do opracowania selektywnych dendrymerów o jeszcze lepszych właściwościach biologicznych, w tym peptydowych dendrymerów o silnych własnościach antyoksydacyjnych mogących znaleźć zastosowanie jako inhibitory w niekontrolowanych procesach utleniania przyczyniających się do wielu procesów chorobowych czy starzenia się komórek.

V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Uwagi ogólne

Wszystkie związki organiczne niezbędne do przeprowadzenia reakcji, dostępne handlowo, stosowano bez ich uprzedniego oczyszczania. Rozpuszczalniki o czystości cz.d.a. zostały zakupione w firmach Sigma-Aldrich, TCI, Linegal Chemicals i użyte bez dodatkowego oczyszczania.

Przebieg prowadzonych reakcji chemicznych kontrolowany był za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żel krzemionkowym Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck, wywoływanych po wysuszeniu w 100°C 20% wodnym roztworem siarczanu amonu lub 1% roztworem ninhydryny w alkoholu etylowym. Płytki obserwowano także w świetle UV przy długości fali 254 nm. Do rozdziału substancji metodą sączenia molekularnego stosowano żel Sephadex LH-20 firmy GE Healthcare. Chromatograficzny rozdział otrzymanych substancji przeprowadzono techniką HPLC na zestawie firmy Beckmann. Czystość związków kontrolowano za pomocą analitycznej chromatografii HPLC na zestawie firmy Knauer.

W celu kontroli przebiegu reakcji sprzęgania kolejnych aminokwasów stosowano test Kaisera, wykorzystujący barwną reakcję wolnych grup aminowych z ninhydryną.

Struktury związków potwierdzono metodami spektroskopowymi. Widma ¹H i ¹³C NMR wykonane zostały na aparacie Varian VNMRS 500/125 MHz lub 600/150 MHz (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Widma masowe wykonano na spektrometrze ESI-MS API 3000 (Applied Biosystems).

1.1 Zdejmowanie osłony Boc

Grupę zabezpieczającą tert-butoksykarbonylową usuwano przez traktowanie związków 1M HCl w octanie etylu (5 ml) przez 4 godziny, a następnie odparowanie rozpuszczalnika pod próżnią. Związki przemywano eterem dietylowym, a osad suszono pod próżnią nad P₂O₅.

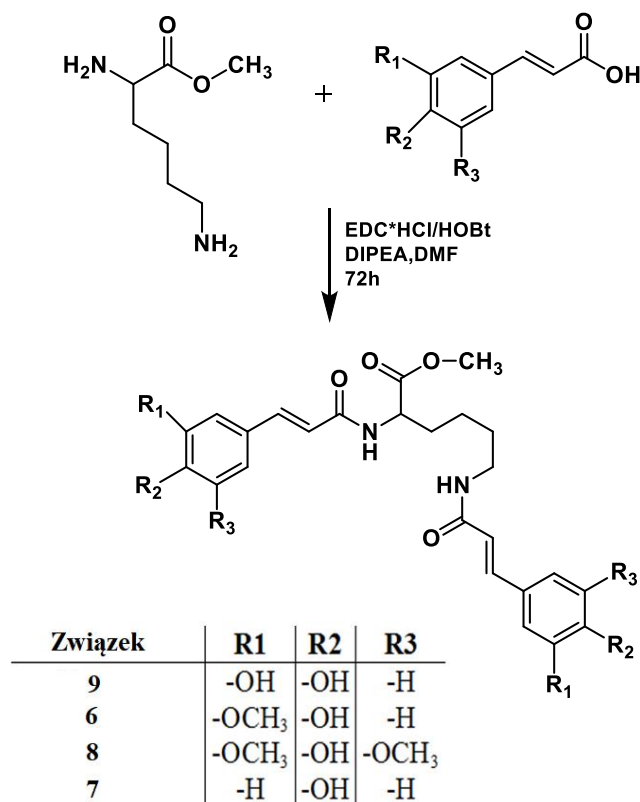
1.2 Zdejmowanie osłony Fmoc

Grupę zabezpieczającą fluororenylometyloksykarbonylową usuwano przez potraktowanie związków 20% roztworem piperydyny w DMF, a następnie odparowanie rozpuszczalnika pod próżnią. Związki przemyto eterem dietylowym, a osady suszono pod próżnią nad P₂O₅.

2. Synteza małych dimerów zawierających pochodne kwasu cynamonowego

Ogólny sposób syntezy

Do kolby reakcyjnej wprowadza się pochodną kwasu cynamonowego w DMF, roztwór ochładza się do 0°C, a następnie dodaje się EDC*HCl, HOBt, Et₃N i Lys-OMe. Reakcję prowadzi się w ciemności przez 2 h w 0°C, a następnie w temperaturze pokojowej przez około 4-5 dni, aż do zaobserwowania całkowitego zaniku substratów za pomocą płytki TLC. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowuje się, a do uzyskanego osadu dodaje się wodę i ekstrahuje trzykrotnie z EtOAc. Połączone warstwy organiczne ekstrahuje się następnie trzykrotnie 5% kw. cytrynowym, NaHCO₃ oraz solanką. Warstwę organiczną suszy się nad MgSO₄, sączy i odparowuje do sucha, a pozostałość oczyszcza na żelu krzemionkowym w układzie 5% MeOH/DCM uzyskując pożądany związek.



Związek 6

Do reakcji użyto: kwas ferulowy (5.44 g, 0.028 mol), HOBt (0.726 g, 0.028 mol), EDC*HCl (5.37 g, 0.028 mol), Et₃N (14.35 ml, 0.103 mol), Lys-OMe (3 g, 0.0129 mol) i 15 ml DMF; czas reakcji – 92 godziny;

produkt (2.51 g, 38%); C₂₇H₃₂O₈N₂, M = 512.56 g/mol

ESI-MS (MeOH): 513.5 [M + H]⁺ i 534.4 [M + Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ: 1.32-1.95 (m, β-CH₂ Lys, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys), 2.62-2.78 (ε-CH₂ Lys), 3.10-3.23 (m, α-CH Lys), 3.83-3.94 (m, OCH₃ kwas ferulowy), 6.54-6.72 (m, 4xH-Ar kwas ferulowy, -CH=CH- kwas ferulowy), 6.87-6.97 (m, ε-NH Lys, α-NH Lys), 7.48-7.55 (m, -OH kwas ferulowy).

Związek 7

Do reakcji użyto: kwas p-kumarynowy (0.44 g, 0.0027 mol), HOBt (0.365 g, 0.0027 mol), EDC*HCl (0.518 g, 0.0027 mol), Et₃N (0.9 ml, 0.00645 mol), Lys-OMe (0.3 g, 0.00129 mol) i 10 ml DMF; czas reakcji – 76 godzin;

produkt (0.3 g, 52%); C₂₅H₂₈O₆N₂, M = 452.51 g/mol

ESI-MS (MeOH): 453.3 [M + H]⁺ i 475.2 [M + Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ: 1.27-1.85 (m, β-CH₂ Lys, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys), 2.68-2.82 (ε-CH₂ Lys), 3.25-3.42 (m, α-CH Lys), 6.43-6.58 (m, H-Ar kwas p-kumarynowy, -CH=CH- kwas p-kumarynowy), 6.82-6.94 (m, ε-NH Lys, α-NH Lys), 7.56-7.68 (m, -OH p-kumarynowy).

Związek 8

Do reakcji użyto: kwas synapinowy (2.12 g, 0.00944 mol), HOBt (1.28 g, 0.00944 mol), EDC*HCl (1.81 g, 0.00944 mol), Et₃N (4.8 ml, 0.103 mol), Lys-OMe (1 g, 0.00429 mol) i 10 ml DMF; czas reakcji – 96 godzin;

produkt (1.32 g, 53.88%); C₂₉H₃₆O₁₀N₂, M = 572.61 g/mol

ESI-MS (MeOH): 573.2 [M + H]⁺ i 595.4 [M + Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ: 1.23-1.98 (m, β-CH₂ Lys, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys), 2.56-2.73 (ε-CH₂ Lys), 2.97-3.25 (m, α-CH Lys), 3.86-3.96 (m, OCH₃ kwas synapinowy), 6.37-6.54 (m, H-Ar kwas synapinowy, -CH=CH- kwas synapinowy), 6.85-6.95 (m, ε-NH Lys, α-NH Lys), 7.40-7.51 (m, -OH kwas synapinowy).

Związek 9

Do reakcji użyto: kwas kawowy (0.968 g, 0.00537 mol), HOBt (0.726 g, 0.00537 mol), EDC*HCl (1 g, 0.00537 mol), Et₃N (2.4 ml, 0.0172 mol), Lys-OMe (0.5 g, 0.00215 mol) i 10 ml DMF; czas reakcji – 94 godziny;

produkt (0.33 g, 31.7%); C₂₅H₂₈O₈N₂, M = 484.49 g/mol

ESI-MS (MeOH): 486.5 [M + H]⁺ i 507.3 [M + Na]⁺.

^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.25-1.82 (m, β -CH₂ Lys, γ -CH₂ Lys, δ -CH₂ Lys), 2.72-2.85 (ϵ -CH₂ Lys), 3.35-3.49 (m, α -CH Lys), 6.46-6.62 (m, H-Ar kwas kawowy, -CH=CH- kwas kawowy), 6.85-6.98 (m, ϵ -NH Lys, α -NH Lys), 7.58-7.72 (m, -OH kawowy)

Związek 10

Do reakcji użyto: kwas hydrokawowy (0.78 g, 0.0043 mol), HOBt (0.636 g, 0.00471 mol), EDC*HCl (0.903 g, 0.00471 mol), Et₃N (1.2 ml, 0.0086 mol), Lys-OMe (0.5 g, 0.00215 mol) i 10 ml DMF; czas reakcji – 89 godzin;

produkt (0.37 g, 35.2%); C₂₅H₃₂O₈N₂, M = 488.53 g/mol

ESI-MS (MeOH): 489.5 [M + H]⁺ i 511.4 [M + Na]⁺.

^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.20-1.98 (m, β -CH₂ Lys, γ -CH₂ Lys, δ -CH₂ Lys), 2.39-2.43 (m, -CH₂ kwas hydrokawowy), 2.72-2.76 (m, -CH₂ kwas hydrokawowy) 2.92-3.25 (m, ϵ -CH₂ Lys), 3.35-3.41 (m, α -CH Lys), 6.49-6.69 (m, H-Ar kwas hydrokawowy), 6.75-6.95 (m, ϵ -NH Lys, α -NH₂ Lys), 7.32-7.4 (m, -OH kwas hydrokawowy).

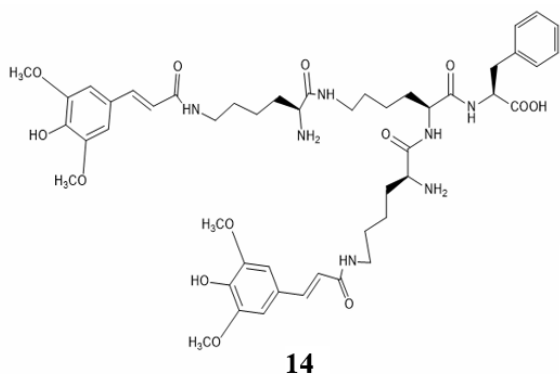
3. Synteza dendronów lizynowych na żywicy 2-chlorotrytylowej

Związek 14

Zabezpieczona Fmoc peptydydożywica Phe-2-CL (żywica 2-chlorotrytylowa z wstępnie osadzoną fenyloalaniną) (1 g; osadzenie: 0.82 mmol/g) pęczniała w DMF przez 2 godziny. Następnie osłona Fmoc została usunięta przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF (2x 5min), a peptydydożywica dokładnie przemyta 5x DMF. Po odsączeniu peptydydożywicę acylowano roztworem zawierającym Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0.775 g; 1.3 mmol), HATU (0.973 g; 2.56 mmol), *N,N'*-diizopropyletyloaminę (DIPEA; 0.827 g; 6.4 mmol) w bezwodnym DMF przez cztery godziny w temperaturze pokojowej.

Po osuszeniu i przemyciu peptydydożywicy 5xDMF wykonano test Kaisera. Grupę Fmoc usunięto jak poprzednio. Po odsączeniu peptydydożywicy procedurę acylowania powtarzano przez cztery godziny roztworem zawierającym Boc-Lys(Fmoc)-OH (1.2 g; 2.56 mmol), HATU (1.946 g; 5.12 mmol), DIPEA (1.65 g; 12.77 mmol) w bezwodnym DMF. Po osuszeniu i przemyciu peptydydożywicy 5xDMF wykonano test Kaisera. Osłonę Fmoc usunięto i peptydydożywicę przemyto 5xDMF. Ostatnią procedurę acylowania prowadzono przez cztery godziny roztworem kwasu synapinowego (0.574 g; 2.56 mmola), DIC (0.646 g; 5.12 mmola), oxymą pure (nr CAS : 3849-21-6); (0.727 g; 5.12 mmola), DIPEA (1.65 g; 12.77 mmola) w bezwodnym DMF. Po osuszeniu i przemyciu żywicy 5xDMF wykonano test Kaisera. W kolejnym etapie odszczepiano związek od żywicy przez potraktowanie peptydydożywicy

roztworem TFA/DCM (5:5) w temperaturze pokojowej przez dwie godziny. Żywicę odsączone i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącano dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wyszuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywnej HPLC przy użyciu kolumny C18, 250 x 21.20 mm, wielkości cząstek 15 μm i średnicy porów 300 Å. Faza ruchoma składała się z gradientu od 5 do 95% MeOH / H₂O, 0.05% HCl, przy prędkości przepływu 3.0 ml / min. Wydajność: 18% (142 mg).



C₄₉H₆₇N₇O₁₃, M.W.: 961.48, m/z: 962.6, Analiza elementarna: C, 61.17; H, 7.02; N, 10.19; O, 21.62

MS (ESI, MeOH): m/z: 984.6 [M + Na]⁺, 962.6 [M + H]⁺

¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.23-1.98 (m, 26H, 3x β CH₂ Lys, 3x γ CH₂ Lys, 3x δ CH₂ Lys, 3x ϵ CH₂ Lys, β CH₂ Phe), 2.97-3.25 (m, 2H, 2x α CH Lys), 3.35-3.41 (m, 2H, α CH Phe, α CH Lys), 3.86-3.96 (m, 12H, 4xOCH₃ kwas synapinowy), 6.37-6.54 (m, 8H, 4xH-Ar kwas synapinowy, 2x -CH=CH- kwas synapinowy), 6.85-6.95 (m, 9H, 5x ϵ NH Lys, 2x α NH₂ Lys), 7.12-7.36 (m, 5H, H-Ar Phe), 7.40-7.51 (m, 2H, 2xOH kwas synapinowy).

Podobnie przeprowadzono syntezę **związku 16**.

1. Przygotowanie żywicy (żywica 2-chlorotrytylowa z wstępnie osadzoną fenyloalaniną 1 g; osadzenie: 0.82 mmol/g pęczniała w DMF przez 2 godziny).
2. Odblokowanie grup aminowej przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
3. I etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

0.98 mmol, 0.581 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;

1.97 mmol, 0.748 g HATU;

4.9 mmol, 0.635 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

4. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.

5. II etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.97 mmol, 0.923 g Boc-Lys(Fmoc)-OH;

3.94 mmol, 1.5 g HATU;

9.84 mmol, 1.272 g DIPEA.

6. Następnie przemyto peptydydożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

7. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF oraz przemycie peptydydożywicy za pomocą DMF.

8. III etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

2.46 mmol, 0.319 g kwasu hydrokawowego;

3.94 mmol, 0.497 g DIC;

3.94 mmol, 0.556 g oxyma pure (nr CAS : 3849-21-6);

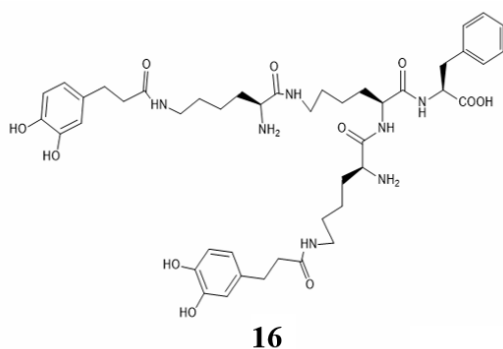
9.84 mmol, 1.27 g DIPEA.

9. Następnie przemyto peptydydożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

10. Odszczepienie związku od żywicy oraz oczyszczanie metodą preparatywnej HPLC.

Peptydydożywicę przeniesiono do kolby okrągłodennej, zalano odgazowanym roztworem 50% TFA w DCM z dodatkiem fenolu i pozostawiono na 4h. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącano dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wysuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywnej HPLC.

Wydajność: 13.9% (100 mg).



$C_{45}H_{63}N_7O_{11}$, M.W.: 878.04, m/z: 877.46; MS (ESI, MeOH): m/z: 878.8 $[M + H]^+$

1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.20-1.98 (m, 26H, $3x\beta CH_2$ Lys, $3x\gamma CH_2$ Lys, $3x\delta CH_2$ Lys, $3x\varepsilon CH_2$ Lys, βCH_2 Phe), 2.39-2.43 (m, 4H, $2xCH_2$ kwas hydrokawowy), 2.72-2.76 (m, 4H, $2xCH_2$ kwas hydrokawowy) 2.92-3.25 (m, 2H, $2x\alpha CH$ Lys), 3.35-3.41 (m, 2H, αCH Phe, αCH Lys), 4.34-4.67 (m, 4H, $4xOH$ kwas hydrokawowy), 6.49-6.69 (m, 8H, $6xH$ -Ar kwas hydrokawowy), 6.75-6.95 (m, 9H, $5x\varepsilon NH$ Lys, $2x\alpha NH_2$ Lys), 7.16-7.32 (m, 5H, H-Ar Phe).

Związek 18

1. Przygotowanie żywicy (żywica 2-chlorotrytylowa z wstępnie osadzoną fenyloalaniną 1.6 g; osadzenie: 0.82 mmol/g pęczniała w DMF przez 2 godziny).
2. Odblokowanie grup aminowej przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
3. I etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

0.787 mmol, 0.465 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;

1.575 mmol, 0.599 g HATU;

3.94 mmol, 0.509 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

4. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
5. II etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.57 mmol, 0.739 g Boc-Lys(Fmoc)-OH;

3.15 mmol, 1.198 g HATU;

7.88 mmol, 1.018 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

6. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
7. III etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.97 mmol, 0.319 g kwas 1-*H*-benzimidazolo-5-karboksyłowy;

3.15 mmol, 1.198 g HATU;

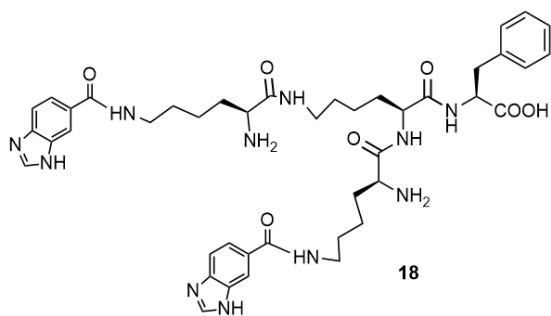
7.88 mmol, 1.018 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

8. Odszczepienie związku od żywicy oraz oczyszczanie metodą preparatywnej HPLC.

Peptydylożywicę przeniesiono do kolby okrągłodennej, zalano odgazowanym roztworem 50% TFA w DCM z dodatkiem fenolu i pozostawiono na 4h. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącano dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wysuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywnej HPLC.

Wydajność: 11.3 % (124 mg).



C₃₉H₅₆N₁₂O₇, M.W.: 804.95, m/z: 804.44; MS (ESI, MeOH): m/z: 805.7 [M + H]⁺

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.39 - 1.59, 1.60 - 1.79, 1.81 - 1.98, (3m, 18H, γ, β, δ CH₂-Lys), 2.88 - 2.96, 3.06 - 3.15 (2m, 2H, CH₂-Phe), 3.16 - 3.26 (m, 2H, ε CH₂-Lys), 3.39 - 3.49 (m, 4H, ε CH₂-Lys), 3.86 - 3.92 (m, 1H, αCH-Lys), 3.93 - 3.99 (m, 1H, αCH-Lys), 4.34 - 4.40 (m, 1H, CH-Lys), 4.51 - 4.58 (m, 1H, αCH-Phe), 7.10 - 7.34 (m, 7H, Phe, NH-benzimidazol), 7.88 - 7.97 (m, 2H, CH-benzimidazol), 8.08 - 8.16 (m, 2H, CH-benzimidazol), 8.34 - 8.40 (m, 2H, CH-benzimidazol), 9.48 - 9.53 (m, 2H, CH-benzimidazol).

Związek 23 (żywica Fmoc-Trp-2Cl)

Synteza przebiegała podobnie jak dla wcześniejszych związków, jednak z zastosowaniem innej żywicy, mianowicie Fmoc-Trp-2Cl o osadzeniu 0.79 mmol/g

1. Przygotowanie żywicy (żywica 2-chlorotrytylowa z wstępnie osadzonym tryptofanem 0.8 g; osadzenie: 0.79 mmol/g pęczniała w DMF przez 2 godziny).
2. Odblokowanie grup aminowej przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
3. I etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

0.785 mmol, 0.448 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;

1.515 mmol, 0.576 g HATU;

3.79 mmol, 0.49 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylozywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

4. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
5. II etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.517 mmol, 0.712 g Boc-Lys(Fmoc)-OH;

3.03 mmol, 1.154 g HATU;

7.58 mmol, 0.98 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylozywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

6. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.

7. III etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.90 mmol, 0.239g kwas 1-metylo-1-*H*-imidazolo-5-karboksyłowy;

3.03 mmol, 1.154 g HATU;

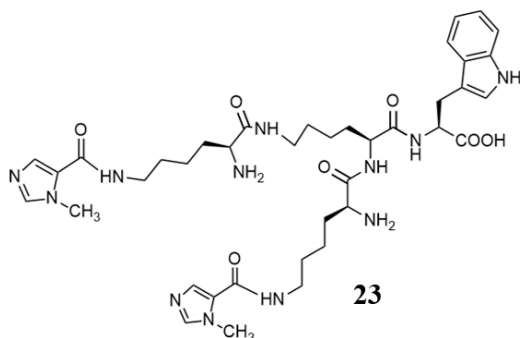
7.58 mmol, 0.98 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

8. Odszczepienie związku od żywicy oraz oczyszczanie metodą preparatywnej HPLC.

Peptydylożywicę przeniosino do kolby okrągłodennej, zalano odgazowanym roztworem 50% TFA w DCM z dodatkiem fenolu i pozostawiono na 4h. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącono dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wysuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywnej HPLC.

Wydajność: 9.2% (46.8 mg).



$C_{43}H_{55}N_{11}O_7$, M.W.: 837.98, m/z: 837.43; MS (ESI, MeOH): m/z: 838.8 [M + H]⁺

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.35 - 1.50, 1.51 - 1.62, 1.63 - 1.72, 1.74 - 1.94 (4m, 18H, γ, β, δ CH₂-Lys), 3.13 - 3.29 (m, 6H, β CH₂-Trp, 2ε CH₂-Lys), 3.35 - 3.39 (ddd, 2H, ε CH₂-Lys), 3.88 (dd, 1H, αCH-Lys), 3.96 (dd, 1H, αCH-Lys), 3.99 (s, 3H, CH₃), 4.06 (s, 3H, CH₃), 4.37 - 4.43 (m, 1H, CH-Lys-core), 4.61 - 4.65 (m, 1H, CH-Trp), 6.95 - 6.99 (m, 1H, Trp), 7.04 - 7.07 (m, 1H, Trp), 7.15 (s, 1H, Trp), 7.30 - 7.33 (m, 1H, Trp), 7.48 - 7.51 (m, 1H, Trp), 8.05 (d, 1H), 8.10 (d, 1H), 8.84 (d, 1H), 8.95 (d, 1H).

4. Synteza dendronów lizynowych na żywicy Tenta Gel S PHB

Związek 27

1. Przygotowanie żywicy (żywica Tenta Gel S PHB z wstępnie osadzoną fenyloalaniną 0.71 g; osadzenie: 0.6 mmol/g pęczniała w DMF przez 4 godziny).
2. Odblokowanie grup aminowej przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
3. I etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:
0.51 mmol, 0.303 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;
1.03 mmol, 0.391 g HATU;
2.57 mmol, 0.332 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

4. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
5. II etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:
1.7 mmol, 1.011 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;
2.13 mmol, 0.813 g HATU;
5.14 mmol, 0.664 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

6. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydylożywicy za pomocą DMF.
7. III etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:
3.42 mmol, 0.737 g Boc-Pro-OH;
4.28 mmol, 1.627 g HATU;
10.27 mmol, 1.328 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydylożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

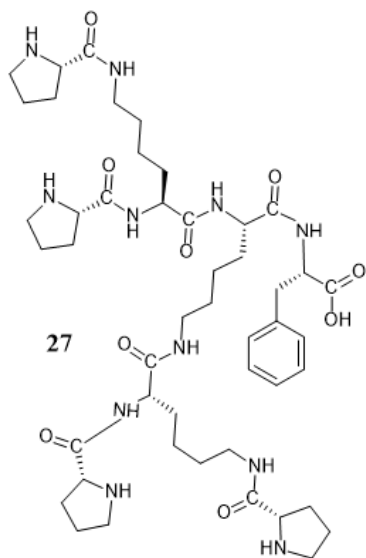
8. Odszczepienie związku od żywicy oraz oczyszczanie metodą preparatywnej HPLC. Peptydylożywicę przeniesiono do kolby okrągłodennej, zalano odgazowanym roztworem TFA/H₂O (9:1) z dodatkiem fenolu i pozostawiono na 4h w temperaturze pokojowej. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią,

a surowy produkt wytrącano dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wyszuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywną HPLC.

Wydajność: 43.7%, (173 mg).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.31 - 1.40 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys), 1.70 - 1.93 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys, CH_2 -Pro), 3.00 - 3.05 (m, CH_2 -Phe, ϵ CH_2 -Lys, CH_2 -Pro), 3.14 - 3.37 (m, CH_2 -Phe, ϵ - CH_2 -Lys), 3.39 - 3.46 (m, α CH -Lys), 3.48 - 3.67 (m, CH -Pro), 3.90 - 3.96 (m, α CH -Phe), 7.11 - 7.17 (m, Ar-Phe).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 26.3 (γ -C-Pro); 31.7 (β -C-Pro); 38.2 (β -C-Phe); 40.3 (β -C-Lys); 41.2 (ϵ -C-Lys); 48.3 (δ -C-Pro); 52.6 (α -C-Lys); 56.4; 62.4 (α -C-Pro); 127.3 (C4Phe); 129.2 (C2,6Phe); 130.7 (C3,5Phe); 139.2 (C1Phe); 174.2, 175.3, 176.0 (CONH).



Związek 29

1. Przygotowanie żywicy (żywica Tenta Gel S PHB z wstępnie osadzoną fenyloalaniną 0.71 g; osadzenie: 0.6 mmol/g pęczniała w DMF przez 4 godziny).
2. Odblokowanie grup aminowej przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydyłyżwicy za pomocą DMF.
3. I etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF: 0.51 mmol, 0.303 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;

1.03 mmol, 0.391 g HATU;

2.57 mmol, 0.332 g DIPEA.

Następnie przemycie peptydyłyżwicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

4. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperydyny w DMF oraz przemycie peptydyłyżwicy za pomocą DMF.

5. II etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

1.7 mmol, 1.011 g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;

2.13 mmol, 0.813 g HATU;

5.14 mmol, 0.664 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydydłożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

6. Odblokowanie grup aminowych przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF oraz przemycie peptydydłożywicy za pomocą DMF.

7. III etap sprzęgania:

Do reaktywnej żywicy dodano następujące ilości reagentów rozpuszczonych w DMF:

3.42 mmol, 0.873 g Boc-His-OH;

4.28 mmol, 1.627 g HATU;

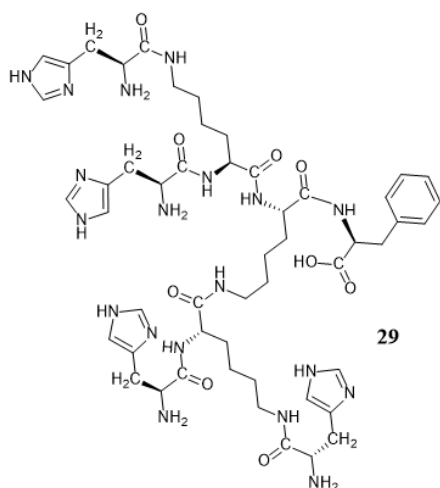
10.27 mmol, 1.328 g DIPEA.

Następnie przemyto peptydydłożywicę DMF oraz wykonano Test Kaisera.

8. Odszczepienie związku od żywicy oraz oczyszczanie metodą preparatywnej HPLC.

Peptydydłożywicę przeniesiono do kolby okrągłodennej, zalano odgazowanym roztworem TFA/H₂O (9:1) z dodatkiem fenolu i pozostawiono na 4h w temperaturze pokojowej. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącano dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wysuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywnej HPLC.

Wydajność: 32.4%.(152 mg)

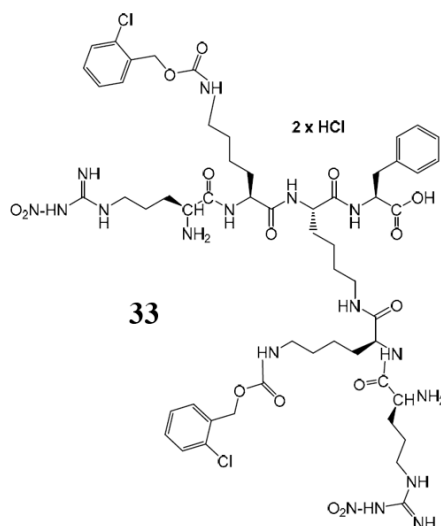


¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.31 - 1.40 (m, γ, β, δ CH₂-Lys), 1.70 - 1.93 (m, γ, β, δ CH₂-Lys, CH₂-Pro), 2.72-2.95 (m, β CH₂-His); 3.00 - 3.05 (m, CH₂-Phe, ε CH₂-Lys), 3.14 - 3.37 (m, CH₂-Phe, ε-CH₂-Lys), 3.39 - 3.46 (m, α CH-Lys), 3.90 - 3.96 (m, α CH-Phe), 4.45-4.51 (m, α CH-His); 6.82-6.87 (m, Ar-His); 7.11 - 7.17 (m, Ar-Phe); 7.56-7.64 (m, Ar-His).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ : 32.5 ($\beta\text{-C-His}$); 38.2 ($\beta\text{-C-Phe}$); 40.3 ($\beta\text{-C-Lys}$); 41.2 ($\epsilon\text{-C-Lys}$); 48.3 ($\delta\text{-C-Pro}$); 49.4, 51.6 ($\alpha\text{-C-Lys}$); 52.2, 52.8, 55.1 ($\alpha\text{-C-His}$); 119.2 ($\text{C}=\text{CH His}$); 127.3 (C4Phe); 129.2 (C2,6Phe); 130.7 (C3,5Phe); 133.9 ($\text{C}=\text{CH His}$); 136.2 ($\text{N-HC}=\text{N His}$); 139.2 (C1Phe); 174.2, 175.3, 176.0 (CONH).

Związek 33

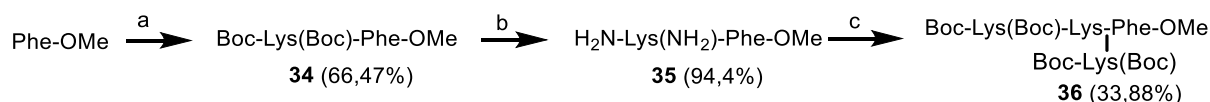
Zabezpieczoną Fmoc peptydylożywicę Phe-Tenta Gel S PHB (2 g; 0.5 mmol/g) nasączano w DMF przez 4 h. Następnie osłona Fmoc została usunięta przy użyciu roztworu 20% piperidyny w DMF (2x 5min), a peptydylożywica dokładnie przemyta 5x DMF. Po odsączeniu peptydylożywicę acylowano roztworem zawierającym Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0.5907 g; 1 mmol), HATU (0.7605 g; 1.86 mmol) oraz DIPEA (0.736 mL, 4.23 mmol) w bezwodnym DMF przez cztery godziny w temperaturze pokojowej. Po osuszeniu i przemyciu peptydylożywicy 5xDMF wykonano test Kaisera. Grupę Fmoc usunięto jak poprzednio. Po odsączeniu peptydylożywicy procedurę acylowania powtarzano przez sześć godzin roztworem zawierającym Fmoc-Lys(2-Cl-Z)-OH (1.0740 g; 2 mmol), HATU (1.5209 g; 4 mmol) oraz DIPEA (1.472 mL, 8.45 mmol) w bezwodnym DMF. Po osuszeniu i przemyciu peptydylożywicy 5xDMF wykonano test Kaisera. Grupę Fmoc usunięto jak poprzednio. Po odsączeniu peptydylożywicy procedurę ostatniego acylowania prowadzono przez 8 godzin roztworem zawierającym Fmoc-Arg(NO_2)-OH (0.8828 g; 2 mmol), HATU (1.5209 g; 4 mmol) oraz DIPEA (1.472 mL, 8.45 mmol) w bezwodnym DMF. Po osuszeniu i przemyciu 5xDMF wykonano test Kaisera. Grupę Fmoc usunięto jak poprzednio. W kolejnym etapie odszczepiano związek od żywicy przez potraktowanie peptydylożywicy roztworem TFA/ H_2O (9:1) w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Żywicę odsączono i przemyto octanem etylu. Następnie substancje lotne zostały usunięte pod próżnią, a surowy produkt wytrącono dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Wysuszony surowy produkt oczyszczano metodą preparatywną HPLC przy użyciu kolumny C18, 250 x 21.20 mm, wielkości cząstek 15 μm i średnicy porów 300 Å. Faza ruchoma składała się z gradientu od 5 do 95% MeOH / H_2O , 0.05% HCl, przy prędkości przepływu 3.0 ml / min. Wydajność: 51.85% (334 mg).



^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.36–2.11 (m, β , γ , δ CH_2 -Lys, γ - CH_2 -Arg), 2.33–2.40 (m, β CH_2 -Arg), 2.92–3.27 (m, CH_2 -Phe, ϵ CH_2 -Lys, δ - CH_2 -Arg), 4.10–4.21 (m, α CH -Lys, CH -Fmoc), 4.34–4.41 (m, α CH -Phe, CH_2 -Fmoc), 4.63–4.676 (m, α CH -Arg), 5.05–5.13 (m, CH_2 -2-Cl-Z), 7.16–7.42 (m, Ar-Phe, Ar-Fmoc, Ar-2-Cl-Z), 7.58–7.65 (m, Ar-2-Cl-Z), 7.73–7.78 (m, Ar-Fmoc)

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 24.0 (γ -C-Lys); 24.3 (γ -C-Arg); 24.8 (β -C-Arg); 30.4 (δ -C-Lys); 32.1 (β -C-Lys); 38.3 (β -C-Phe); 41.5 (ϵ -C-Lys); 41.8 (δ -C-Arg); 48.4 (α -C-Arg); 53.5 (α -C-Lys); 55.8 (α -C-Phe); 64.6 (β -C 2ClZ); 126.2 (C4Phe); 128.1 (C5 2ClZ); 128.2 (C6 2ClZ); 128.8 (C3,4 2ClZ); 130.3 (C2,6Phe); 130.4 (C3,5Phe); 138.2 (C1 Phe); 142.6 (C2 2ClZ); 145.3 (C1 2ClZ); 158.4, 158.6 (C=NH Arg); 174.5, 175.2, 176.6, 177.2 (CONH).

5. Synteza dendronów lizynowych w roztworze



Związek oznaczony numerem **34** (4.3 g, 8.5 mmol) otrzymano przez dodanie do Boc-Lys(Boc)-OH (5.17 g, 15 mmol) rozpuszczonej w 30ml THF, HOAt (2.18 g, 16 mmol) i DCC (3.3 g, 16 mmol) rozpuszczonych w 15 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu estru metylowego fenyloalaniny w 20 ml THF (Phe-OMe 3.23 g, 15 mmol) oraz TEA (12 g, 120 mmol) i mieszano przez 72 godz. w temp. pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 i solanką, suszono nad MgSO_4 , przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM. Następnie związek **34** przekształcono w dichlorowodorek **35** przez odbezpieczenie grup Boc za pomocą nasyconego 1M HCl w EtOAc.

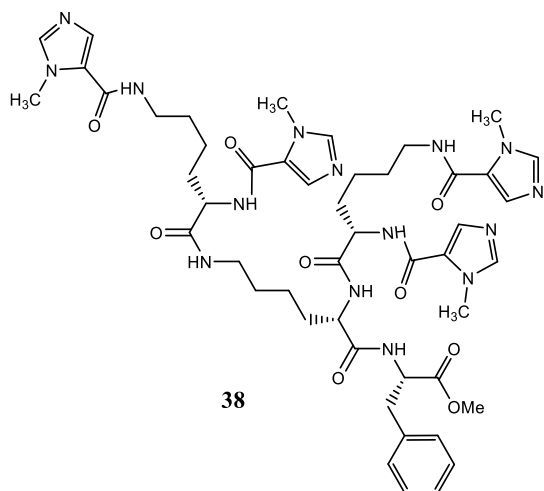
Związek oznaczony numerem **36** (0.98 g, 1 mmol) otrzymano przez dodanie do Boc-Lys(Boc)-OH (2.29 g, 6.6 mmol) rozpuszczonej w 20 ml THF, HOAt (0.898 g, 6.6 mmol) i DCC (1.36 g, 6.6 mmol) rozpuszczonych w 15 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu zawierającego związek **35** (1 g, 3 mmol) w 15 ml THF oraz TEA (4.85 g, 48 mmol) i mieszano przez 120 godz. w temp. pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM. Uzyskano 0.98 g **związku 36**, wydajność 64.9 %.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.31 - 1.40 (m, γ, β, δ CH₂-Lys), 1.41 - 1.45 (m, CH₃-*t*-Bu), 1.70 - 1.93 (m, γ, β, δ CH₂-Lys), 3.00 - 3.05 (m, CH₂-Phe, ε CH₂-Lys), 3.14 - 3.37 (m, CH₂-Phe, ε-CH₂-Lys), 3.39 - 3.46 (m, α CH-Lys), 3.66 (s, OMe); 3.90 - 3.96 (m, α CH-Lys), 7.11 - 7.17 (m, Ar-Phe)

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 24.4 (γ-C-Lys); 26.3 (δ-C-Lys); 28.9, 29.0 [C(CH₃)₃(Boc)]; 32.7 (β-C-Lys); 37.3 (β-C-Phe); 40.3 (ε-C-Lys); 52.6 (α-C-Lys); 56.4 (α-C-Phe); 80.0, 80.7 [C^{IV}(CH₃)₃(Boc)]; 126.2 (C₄Phe); 130.3 (C_{2,6}Phe); 130.4 (C_{3,5}Phe); 138.2 (C₁ Phe); 154.6, 158.7 [C=O (Boc)]; 174.2, 175.3, 176.0 (CONH).

Związek 38

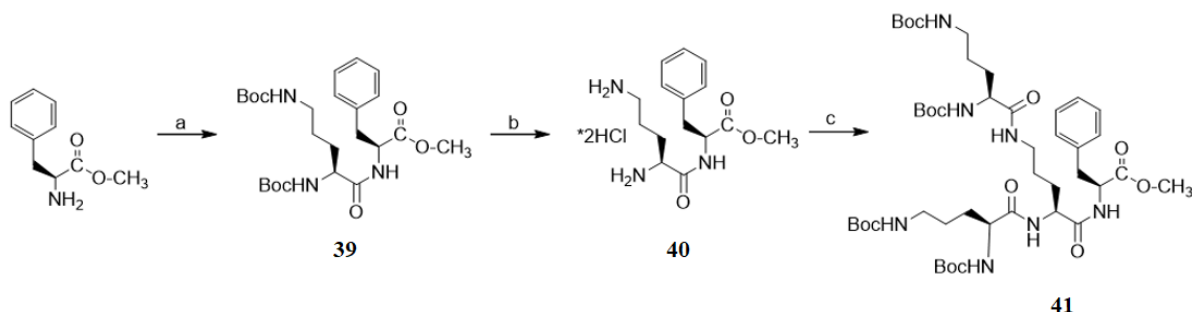
Kwas 1-metylo-1H-imidazolo-5-karboksylowy (0.17 g, 1.2 mmol) HOSu (0.14 g, 1.2 mmol) i DCC (0.29 g, 1.4 mmol) rozpuszczono w THF i mieszano przez noc. Następnie wytworzony aktywny ester dodano do roztworu zawierającego odbezpieczony dendron lizynowy **37** (0.19 g, 0.27 mmol) i TEA (0.97 g, 9.6 mmol) w THF i mieszano przez 96 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowano, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemyto roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przesączono i przesącz odparowano. Surowy dendron oczyszczano metodą preparatywnej HPLC przy użyciu kolumny C₁₈, 250 x 21.20 mm, wielkości cząstek 15 μm i średnicy porów 300 Å. Faza ruchoma składała się z gradientu od 5 do 95% MeOH / H₂O, 0.05% HCl, przy prędkości przepływu 3.0 ml / min. Wydajność: 20.45%.



^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.35 - 1.50, 1.51 - 1.62, 1.63 - 1.72, 1.74 - 1.94 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys); 3.13 - 3.20 (m, CH_2 -Phe, ϵ CH_2 -Lys); 3.56 (s, OMe); 3.75 (s, CH_3 - imidazol); 3.96 (dd, αCH -Lys); 4.24-4.31 (m, α CH-Phe); 7.16-7.32 (m, Ar-Phe); 7.84 - 8.21 (m, CH - imidazol)

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ : 23.4 (γ -C-Lys); 24.2 (δ -C-Lys); 29.8 (β -C-Lys); 33.8 (CH_3 - imidazol); 36.7 (β -C-Phe); 40.3 (ϵ -C-Lys); 51.9 (α -C-Lys); 56.2 (α -C-Phe); 126.2 (C4Phe); 128.7 (C2,6Phe); 129.0 (C3,5Phe); 132.8 (CH - imidazol); 139.3 (C1 Phe); 150.2 (CH - imidazol); 170.0, 170.1, 173.6, 174.8 (CONH).

6. Synteza dendronów ornitynowych w roztworze



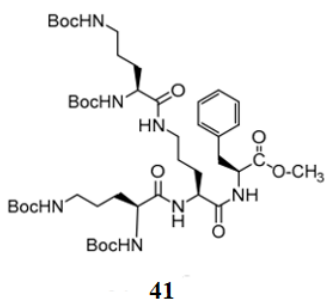
Ogólny sposób syntezy dendronów ornitynowych

Sposób wytwarzania Boc-zabezpieczonego zbudowanego z ornityny (Orn) dendronu **41** polega na tym, że prowadzi się reakcję sprzęgania Boc-zabezpieczonej ornityny (Orn) najpierw z estrem metylowym fenyloalaniny, a następnie z wytworzonym dipeptydem Orn-Phe-OMe metodą estrów aktywnych w roztworze w kombinacji z metodą rozbieżną syntezy dendrymerów. Regentami do prowadzenia reakcji sprzęgania są *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i *N*-hydroksysukcynimid (HOSu), a rozpuszczalnikiem stosowanym podczas reakcji jest tetrahydrofuran (THF), ponadto dodaje się 10 % nadmiar odpowiedniego estru aktywnego w stosunku do każdej wolnej grupy

aminowej (np. Boc-Orn(Boc)-OSu). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 3-5 dni w obecności trietyloaminy (TEA) monitorując jej postęp na płytkach TLC. Wartość pH podczas przebiegu każdej reakcji sprzęgania jest kontrolowana. Ponadto, w wielu przypadkach obserwuje się spadek wartości pH poniżej 10 po 24 h i wobec tego dodaje się do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Po zakończeniu reakcji roztwór odparowuje się do sucha, a pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i przemywa 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem NaHCO₃, a następnie solanką, suszy nad MgSO₄, filtruje i odparowuje do sucha *in vacuo*. Związki oczyszcza się wstępnie na żelu krzemionkowym lub na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, a następnie na kolumnie preparatywnej HPLC. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się produkt w postaci jasno żółtego oleju.

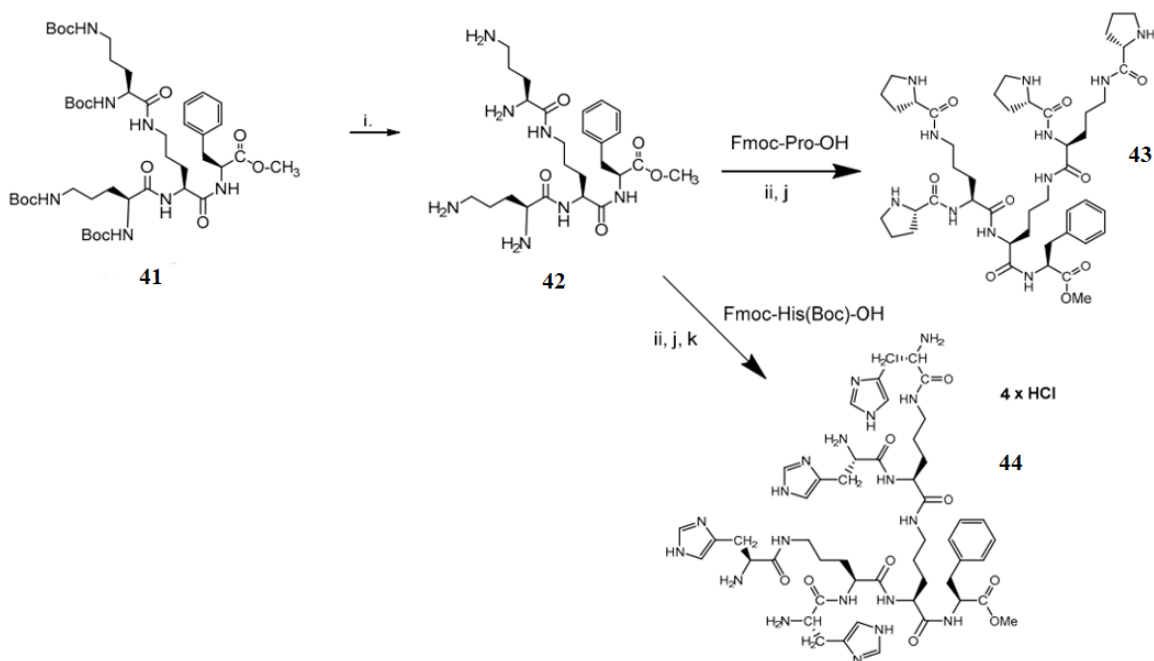
Związek oznaczony numerem **39** (6.07 g, 12.3 mmol) otrzymano przez dodanie do Boc-Orn(Boc)-OH (4.5 g, 13.54 mmol) rozpuszczonej w 20ml THF, HOSu (1.56 g, 13.54 mmol) i DCC (2.79 g, 13.54 mmol) rozpuszczonych w 10 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu estru metylowego fenyloalaniny w 10 ml THF (Phe-OMe 2.92 g, 13.54 mmol) oraz TEA (8.22 g, 81 mmol) i mieszano przez 72 godz. w temp. pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM. Następnie związek **39** przekształcono w dichlorowodorek **40** przez odbezpieczenie grup Boc za pomocą nasyconego 1M HCl w EtOAc.

Związek oznaczony numerem **41** (3.82 g, 4.1 mmol) otrzymano przez dodanie do Boc-Orn(Boc)-OH (2.92 g, 8.8 mmol) rozpuszczonej w 15 ml THF, HOSu (1 g, 8.8 mmol) i DCC (1.82 g, 8.8 mmol) rozpuszczonych w 10 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu zawierającego związek **40** (1.47 g, 4mmol) w 10 ml THF oraz TEA (6.47 g, 64 mmol) i mieszano przez 72 godz. w temp. pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek **41** oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM.



^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.39 – 1.45 (t-Bu); 1.49 – 1.81 (m, CH_2 - β , γ -Orn); 3.00 – 3.07 (m, CH_2 - δ -Orn, CH_2 -Phe); 3.09 – 3.19 (m, CH_2 - δ -Orn, CH_2 -Phe); 3.19 – 3.26 (m, CH_2 - δ -Orn); 3.66 (s, OMe); 3.95 – 4.04 (m, CH α -Orn); 4.35 – 4.41 (m, α -Orn), 4.64. (m, α -Phe); 7.15 – 7.30 (m, Phe).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ : 26.6 (γ -C-Orn); 28.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{Boc})$]; 31.0 (β -C-Orn); 38.4 (δ -C-Orn); 39.6 (β -C-Phe); 52.8 (α -C-Phe); 55.7, 55.9 (α -C-Orn); 79.9, 80.6 [$\text{C}^{\text{IV}}(\text{CH}_3)_3(\text{Boc})$]; 127.9 (C4 Phe); 129.6 (C2,6 Phe); 130.3 (C3,5 Phe); 138.1 (C1 Phe); 157.7, 158.5 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc)]; 173.3, 173.7, 175.0, 175.1 (CONH).



Związek 43

Fmoc-Pro-OH (1.34 g, 3.96 mmol) HOSu (0.46 g, 3.96 mmol) i DCC (0.91 g, 4.4 mmol) rozpuszczono w THF i mieszano przez noc. Następnie wytworzony aktywny ester dodano do roztworu zawierającego odbezpieczony dendron ornitynowy **42** (0.3 g, 0.33 mmol) i TEA (0.801 g, 7.92 mmol) w THF i mieszano przez 96 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowano, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemyto roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym NaHCO_3 i solanką, suszono nad MgSO_4 , przesączono

i przesącz odparowano. Surowy dendron oczyszczano metodą preparatywnej HPLC przy użyciu kolumny C18, 250 x 21.20 mm, wielkości cząstek 15 μm i średnicy porów 300 Å. Faza ruchoma składała się z gradientu od 5 do 95% MeOH / H₂O, 0.05% HCl, przy prędkości przepływu 3.0 ml / min. W ostatnim etapie usunięto osłony Fmoc za pomocą roztworu 20% piperydyny w metanolu. Wydajność: 66.7%

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ : 1.43–2.26 (m, CH₂- β , γ -Orn, CH₂-Pro), 2.83–3.27 (m, CH₂-Phe, CH₂- δ -Orn), 3.52–3.68 (m, CH₂-Pro, OMe), 4.22–4.47 (m, CH- α -Orn, CH- α -Pro), 4.57–4.68 (m, CH-Phe), 7.10–7.31 (m, Ar-Phe).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 25.6 (γ -C-Pro); 26.5 (γ -C-Orn); 30.3 (β -C-Orn); 31.1 (β -C-Pro); 38.4 (β -C-Phe); 39.8 (δ -C-Orn); 48.0, 48.3 (δ -C-Pro); 52.7 (α -C-Phe); 54.4, 55.3 (α -C-Orn); 65.0, 66.3 (α -C-Pro); 127.9 (C4Phe); 129.5 (C2,6Phe); 130.4 (C3,5Phe); 138.1 (C1Phe); 173.2, 173.3, 174.2, 175.5 (CONH).

Związek 44

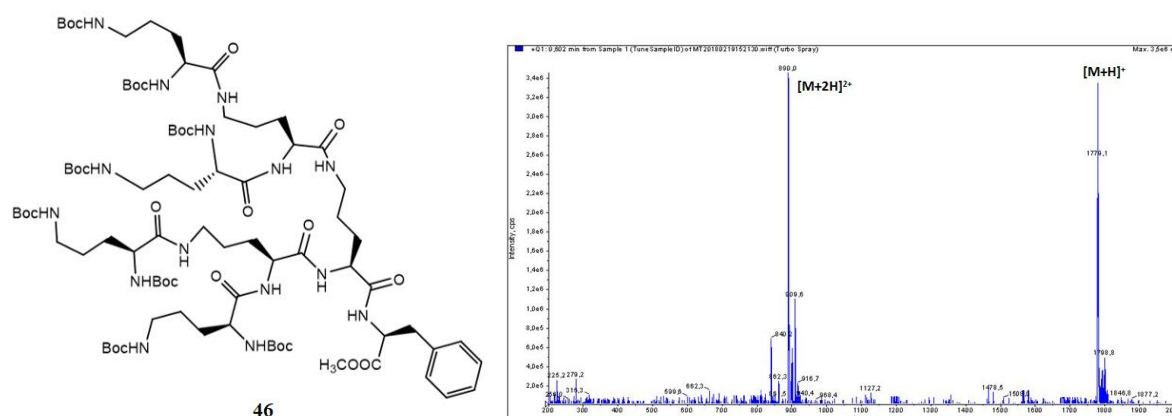
Fmoc-His(Boc)-OH (3.3 g, 5.73 mmol) HOSu (0.6 g, 5.73 mmol) i DCC (1.29 g, 5.73 mmol) rozpuszczono w THF i mieszano przez noc. Następnie wytworzony aktywny ester dodano do roztworu zawierającego odbezpieczony dendron ornitynowy **42** (0.44 g, 0.48 mmol) i TEA (1.16 g, 11.46 mmol) w THF i mieszano przez 96 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowano, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemyto roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przesączono i przesącz odparowano. Surowy dendron oczyszczano metodą preparatywnej HPLC przy użyciu kolumny C18, 250 x 21.20 mm, wielkości cząstek 15 μm i średnicy porów 300 Å. Faza ruchoma składała się z gradientu od 5 do 95% MeOH / H₂O, 0.05% HCl, przy prędkości przepływu 3.0 ml / min. W ostatnim etapie usunięto osłony Fmoc za pomocą roztworu 20% piperydyny w metanolu. Wydajność: 49.68 %.

¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.12–1.83 (m, CH₂ - β , γ -Orn); 3.31–3.38 (m, CH₂ β -His, δ -Orn, CH₂ β -Phe); 3.40–3.47 (m, CH α -Orn); 3.48–3.57 (m, CH₂- δ -Orn); 3.63–3.66 (m, CH α -Orn); 4.21–4.28 (m, CH- α -His); 7.36–7.40 (m, Ar-Phe); 7.52–7.55 (m, Ar-His); 8.93–8.96 (m, Ar-His).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 25.4 (γ -C-Orn); 26.0, 26.6 (β -C-Orn); 27.7 (δ -C-Orn); 44.1, 45.9 (β -C-His); 48.1 (β -C-Phe); 49.8, 50.2 (δ -C-Orn); 53.4 (α -C-Phe); 52.1, 55.5 (α -C-Orn); 60.5, 61.9 (α -C-His); 119.7 (C=CH His); 127.2 (C4Phe); 128.7 (C2,6Phe); 129.7 (C3,5Phe); 134.5 (C=CH His); 135.6 (N-HC=N His); 137.8 (C1Phe); 167.9 (CONH Phe); 172.2, 173.2, 174.2, 177.2 (CONH).

Dendron ornitynowy II generacji - związek 46

Związek oznaczony numerem **46** (1.35 g, 0.76 mmol) otrzymano poprzez reakcję odbezpieczonego dendronu ornitynowego **42** (po usunięciu osłon Boc) z estrem aktywnym Boc-Orn(Boc)-OSu. Ester aktywny przygotowano poprzez dodanie do Boc-Orn(Boc)-OH (3.3 g; 9.9 mmol) rozpuszczonej w 20 ml THF, HOSu (1.14 g, 9.9 mmol) i DCC (2.04 g, 9.9 mmol) rozpuszczonych w 15 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu zawierającego odbezpieczony dendron **42** (1.5 g; 2.25 mmol) rozpuszczony w 15 ml THF oraz TEA (7.29 g, 72 mmol) i mieszano przez 168 godz. w temp. pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM. W ten sposób otrzymano dendron II generacji o wzorze przedstawionym poniżej – **związek 46**. Wydajność: 34.7 %



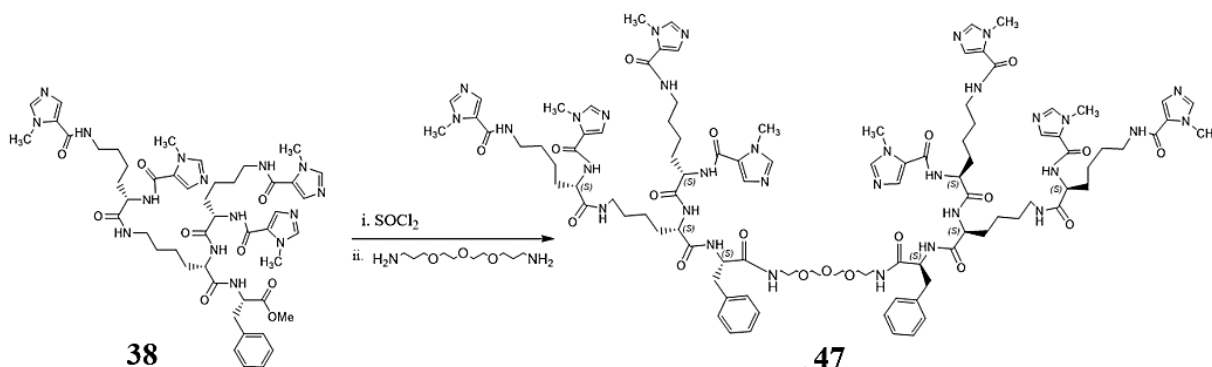
Rys. 58. Dendron ornitynowy drugiej generacji oraz jego widmo ESI-MS.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ: 1.26-1.66 (m, *t*-Bu, CH₂-β, γ-Orn), 2.79 – 3.08 (m, CH₂-Phe, CH₂-δ-Orn) 3.55 (s, OMe), 3.77 – 3.91 (m, CH-α-Orn), 4.17 – 4.31 (m, CH-α-Orn), 4.41 – 4.50 (m, CH-α-Phe), 6.70 – 6.77 (m, NH-Boc), 7.15-7.28 (m, Ar-Phe), 7.67 – 7.78 (m, NH-α-Orn), 7.83 – 7.91 (m, NH-Boc), 8.25 – 8.30 (m, NH-α-Phe)

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 25.4, 25.5, 26.1 (γ-C-Orn); 29.3, 29.7 [C(CH₃)₃(Boc)]; 36.7 (β-C-Orn); 38.2 (β-C-Phe); 39.5 (δ-C-Orn); 51.8 (COOCH₃ Phe); 51.9, 53.5 (α-C-Phe); 54.0, 54.2 (α-C-Orn); 77.3, 77.9, 78.1 [C^{IV}(CH₃)₃(Boc)]; 126.5 (C⁴ Phe); 128.2 (C^{2,6} Phe); 129.0 (C^{3,5} Phe); 136.9 (C¹ Phe); 155.2, 155.3, 155.4, 155.5, 171.2 (O=COCH₃ Phe); 171.5, 171.6, 171.8, 171.9 (CONH).

7. Synteza dendrymerów typu „bola”

7.1 Synteza według strategii 1 – Związek 47



Dendron lizynowy **38** (50 mg, 0.05 mmol) rozpuszczono w 5 ml DCM i przekształcono w chlorek kwasowy z zastosowaniem 3 ml SOCl_2 . Następnie do przygotowanego dendronu w postaci chlorku kwasowego wprowadzono TEA (0.02 g; 0.2 mmol) oraz glikol *O,O'*-bis(2-aminoetylo)polietylenowy (5.5 mg, 0.025 mmol) i całość mieszano pod argonem przez 44 h. W kolejnym etapie rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 15 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 i solanką, suszono nad MgSO_4 , przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na analitycznej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/ H_2O , z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 0.7 ml/min uzyskując lizynowy dendrymer „bola” sfunkcjonalizowany metyloimidazolem. Wydajność: 11.32%.

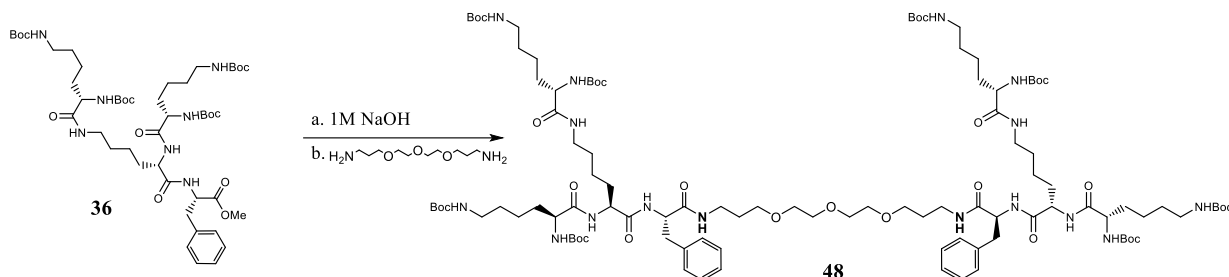
^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.47–1.83 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys); 2.97–3.27 (m, CH_2 -Phe, ϵ CH_2 -Lys, HN- CH_2 -łącznik); 3.60–3.67 (m, -O- CH_2 , łącznik); 3.78 (s, CH_3 - imidazol); 3.94–4.05 (m, α CH-Lys); 4.30–4.35 (m, α CH-Phe); 7.12–7.24 (m, Ar-Phe); 7.82 - 8.12 (m, CH - imidazol).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ : 23.9 (γ -C-Lys); 26.4 (δ -C-Lys); 30.1 (β -C-Lys); 33.7 (CH_3 - imidazol); 38.4 (β -C-Phe); 39.5 (NH- CH_2 łącznik); 40.9 (ϵ -C-Lys); 51.7 (α -C-Lys); 55.6 (α -C-Phe); 69.9 (O- CH_2 łącznik); 71.1, 71.3 (O- CH_2 łącznik); 126.8 (C4Phe); 129.2 (C2,6Phe); 130.7 (C3,5Phe); 132.8 (CH - imidazol); 139.2 (C1Phe); 150.8 (CH - imidazol); 174.8, 175.1, 177.2 (CONH).

7.2 Synteza według strategii 2

7.2.1 Synteza rdzeni dendrymerów typu „bola”

Związek 48

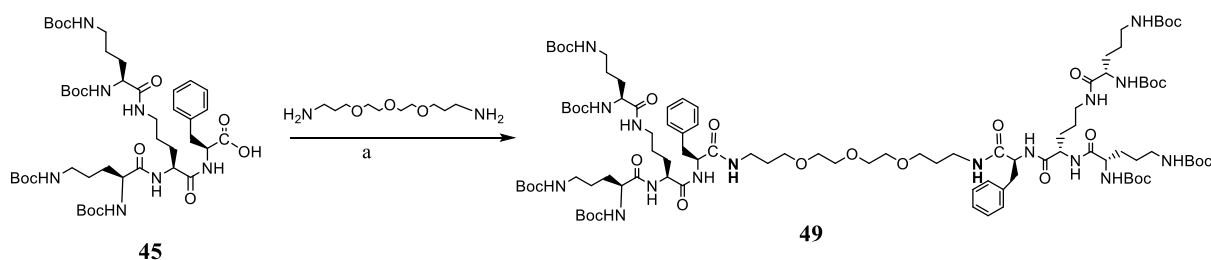


Ester aktywny dendronu lizynowego **36** (0.44 g, 0.46 mmol) otrzymano przez dodanie do dendronu HOSu (0.053 g, 0.46 mmol) i DCC (0.095 g, 0.46 mmol) rozpuszczonych w 10 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu glikolu *O,O'*-bis(2-aminoetylo)polietylenowego (0.051 g, 0.23 mmol) oraz TEA (0.186 g, 1.84 mmol) rozpuszczonych w 5 ml THF i mieszano przez 96 godz. w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 30 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na preparatywnej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min uzyskując lizynowy rdzeń dendrymeru „bola” – związek **48**.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.31 - 1.40 (m, γ, β, δ CH₂-Lys); 1.41 - 1.45 (m, CH₃-*t*-Bu); 1.70 - 1.93 (m, γ, β, δ CH₂-Lys); 3.00 - 3.05 (m, CH₂-Phe, ε CH₂-Lys); 3.14 - 3.37 (m, CH₂-Phe, ε-CH₂-Lys, CH₂-łącznik); 3.39 - 3.46 (m, α CH-Lys); 3.48 - 3.67 (m, CH₂-łącznik); 3.90 - 3.96 (m, α CH-Lys); 7.11 - 7.17 (m, Ar-Phe).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 24.4 (γ-C-Lys); 26.3 (δ-C-Lys); 28.9 (β-C-Lys); 29.0 [C(CH₃)₃(Boc)]; 33.9 (β-C-Phe); 38.6 (NH-CH₂ łącznik); 40.3 (ε-C-Lys); 52.6 (α-C-Lys); 56.4 (α-C-Phe); 70.0, 71.4 (O-CH₂ łącznik); 80.0, 80.7 [C^{IV}(CH₃)₃(Boc)]; 126.8 (C4Phe); 129.2 (C2,6Phe); 130.7 (C3,5Phe); 139.2 (C1Phe); 154.6, 158.7 [C=O (Boc)]; 174.2, 175.3, 176.0 (CONH).

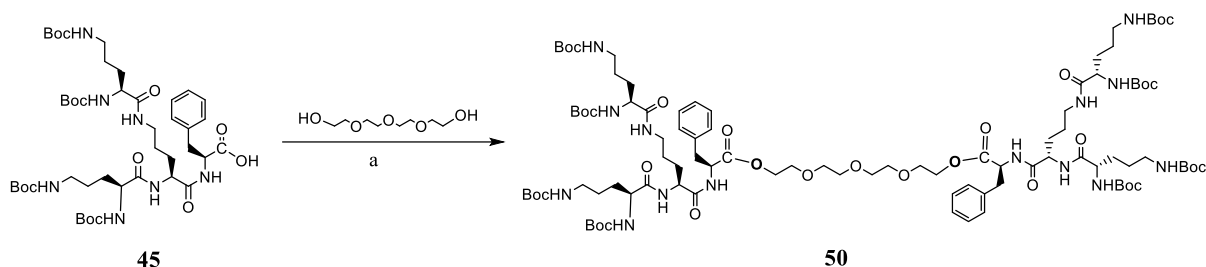
Związek 49



Ester aktywny dendronu **45** (1.6 g, 1.76 mmol) otrzymano przez dodanie do dendronu HOSu (0.2 g, 1.76 mmol) i DCC (0.39 g, 1.89 mmol) rozpuszczonych w 15 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu glikolu O,O'-Bis(2-aminoetylo)polietylenowego (0.19 g, 0.88 mmol) oraz TEA (0.356 g, 3.52 mmol) rozpuszczonych w 5 ml THF i mieszano przez 96 godz. w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na preparatywnej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Wydajność 66.9%.

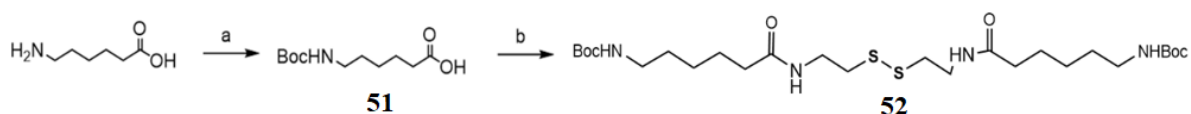
¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.36–1.46 (m, 36H, -CH₃–Boc); 1.47–1.83 (m, 12H, -CH₂β, γ-Orn); 2.97–3.27 (m, 10H, -CH₂β-Phe); HN-CH₂-łącznik, CH₂δ-Orn); 3.60–3.67 (m, 6H, -O-CH₂, łącznik); 3.94–4.05 (m, 2H, CH α-Orn); 4.30–4.35 (m, 1H, CHα-Orn); 4.43–4.48 (m, 1H, CHα-Phe); 7.12–7.24 (m, 5H, Ar-Phe).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 26.4 (γ-C-Orn); 27.3, 27.5 (γ-C-Orn); 28.8 [C(CH₃)₃(Boc)]; 30.5, 30.7, 30.9 (β-C-Orn); 39.0 (β-C-Phe); 39.5 (NH-CH₂ łącznik); 39.6 (δ-C-Orn); 40.9 (δ-C-Orn); 54.2 (α-C-Phe); 55.6 (α-C-Orn); 55.9 (α-C-Orn); 57.1 (α-C-Orn); 69.9 (O-CH₂ łącznik); 71.1, 71.3 (O-CH₂ łącznik); 79.9 [C^{IV}(CH₃)₃(Boc)]; 80.6 [C^{IV}(CH₃)₃(Boc)]; 127.3 (C₄Phe); 129.2 (C_{2,6}Phe); 130.7 (C_{3,5}Phe); 139.2 (C₁Phe); 157.8, 158.5 [C=O (Boc)]; 172.8 (CONH Phe) 174.8, 175.1, 177.2 (CONH).

Związek 50

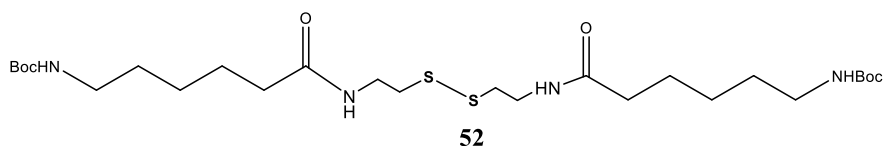
Zastosowano zmodyfikowaną procedurę opisaną w *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016 1;26(15):3586-9.[127]

Do dendronu **45** (0.78 g, 0.86 mmol), rozpuszczonego w 10 ml THF dodano DMAP (0.105 g, 0.86 mmol) oraz DCC (0.185 g, 0.898 mmol), a następnie do roztworu wprowadzono glikol tetraetylenowy (0.08 g, 0.43 mmol). Całość mieszano przez 96 godz. w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na preparatywnej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Wydajność 58.1%.

Związek 52 – łącznik zawierający mostek disiarczkowy

15 g kwasu ε-aminokapronowego rozpuszczono w 30 ml roztworu MeOH:H₂O (1:1) i dodano 9.577 g NaHCO₃ oraz wkroplono 26.8 g Boc₂O rozpuszczonego w 50 ml MeOH. Reakcję prowadzono przez 24h w temp. pokojowej. Następnie odparowano mieszaninę uzyskując olej do którego dodano 18 ml 15% kw. cytrynowego w celu zakwaszenia roztworu do wartości pH 3. Następnie dodano 80 ml EtOAc i ekstrahowano 3x warstwę wodną zbierając warstwy organiczne. Połączone warstwy organiczne przemyto wodą do odczynu obojętnego, odparowano oraz suszono uzyskując 22.17 g związku **51** z wydajnością 84.3%.

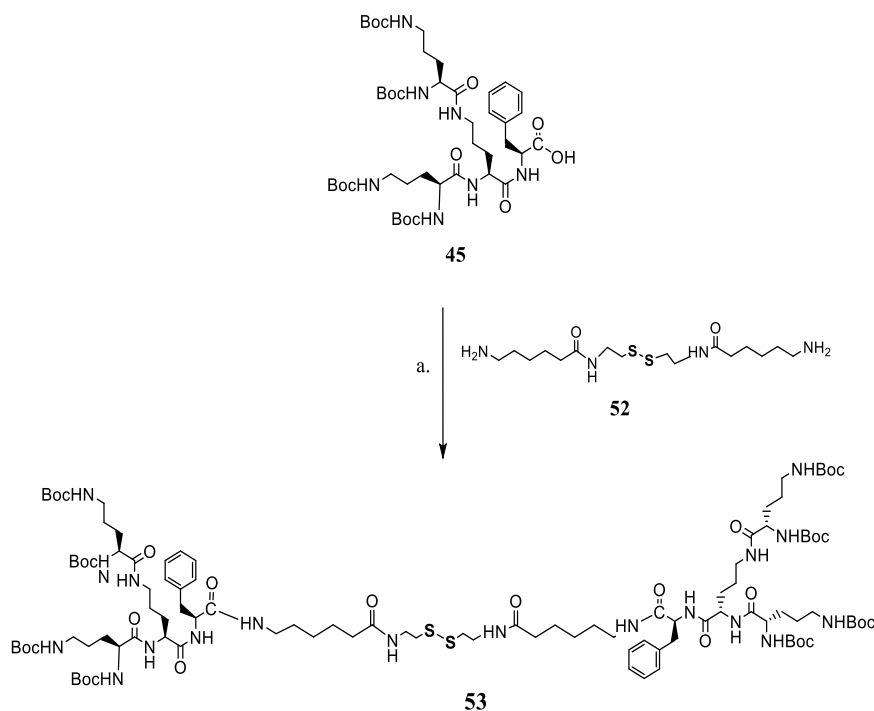
Do 1.5 g (6.5 mmol) Boc-zabezpieczonego związku **51** rozpuszczonego w 10 ml THF dodano HOSu (0.7475 g, 6.5 mmol) oraz DCC (1.46 g, 7.1 mmol), a następnie wkroplono TEA oraz 0.71 g (3.15 mmol) cystaminy. Reakcję prowadzono w temp. pokojowej przez 96h. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Związek oczyszczono na żelu krzemionkowym Kieselgel firmy Merck, a faza ruchoma składała się z gradientu od 1-5% MeOH/DCM. Otrzymano 0.91 g związku **52** z wydajnością 51.6%.



¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ : 1.29 – 1.35 (m, *t-Bu*, β -CH₂-kw. kapronowy); 1.43 – 1.51 (m, γ -CH₂-kw. kapronowy); 1.58 – 1.64 (m, δ -CH₂-kw. kapronowy); 2.29 – 2.34 (m, α -CH₂-kw. kapronowy); 2.50 – 2.54 (m, CH₂-S Cystamina); 2.61 – 2.66 (m, ϵ -CH₂-NH kw. kapronowy); 2.99 – 3.04 (m, CH₂-NH- cystamina).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃O, δ : 25.7 (β -C- kapronowy); 27.3 (γ -C- kapronowy); 28.2, 28.8 (CH₃ Boc); 29.6 (δ -C- kapronowy); 30.6, 34.7 (α -C- kapronowy); 36.3 (C przy S Cystamina); 39.6 (C przy NH- cystamina); 41.1 (ϵ -C- kapronowy); 79.8 (C^{IV} Boc); 158.5, 175.8 (CONH).

Synteza rdzenia dendrymeru „bola” zawierającego mostek disiarczkowy – związek **53**



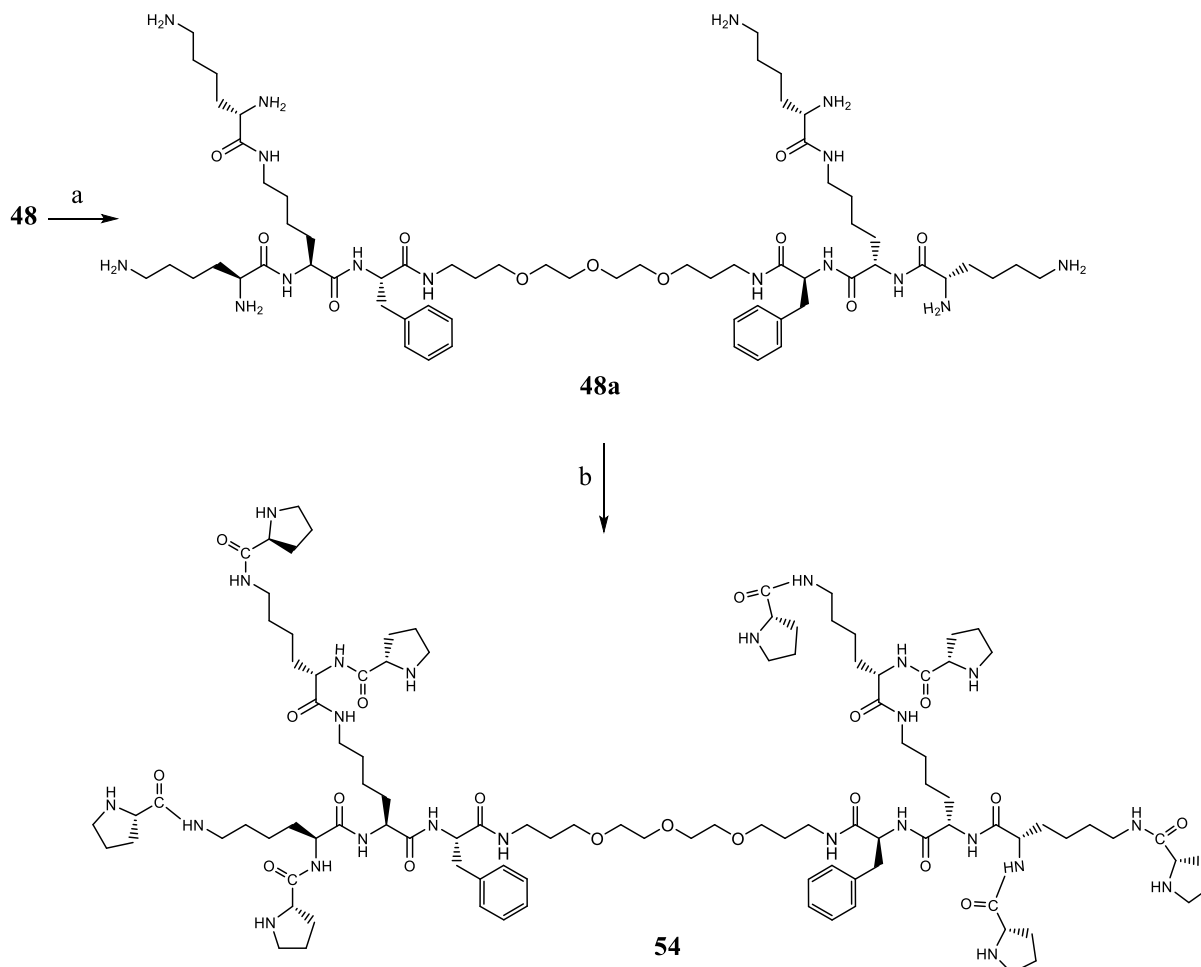
Ester aktywny dendronu **45** (1 g, 1.11 mmol) otrzymano przez dodanie do dendronu HOSu (0.14 g, 1.22 mmol) i DCC (0.25 g, 1.22 mmol) rozpuszczonych w 10 ml THF i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu THF zawierającego odbezpieczony łącznik **52** (0.2 g, 0.53 mmol) oraz TEA i całość mieszano przez 96 godz. w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 30 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Dendrymeryczny produkt oczyszczono metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem uzyskując 0.47 g związku **53** z wydajnością 41%.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ: 1.32 – 1.37 (m, β-CH₂-kw. kapronowy); 1.46 – 1.77 (m, CH₂-*Orn*, δ, γ-CH₂-kw. kapronowy); 2.27 – 2.40 (m, CH₂-*Orn*, α-CH₂-kw. kapronowy); 2.61 – 2.66 (m, ε-CH₂-NH kw. kapronowy); 2.94 – 3.10 (m, N-CH₂-*Orn*, CH₂-*Phe*, S-CH₂ Cystamina); 3.11 – 3.23 (m, β-CH₂-*Phe*, N-CH₂-Cystamina); 3.68 – 3.74 (m, CH-*Orn*); 3.91 – 3.96 (m, α-CH-*Orn*); 4.62 – 4.68 (m, α-CH-*Phe*); 7.10 – 7.31 (m, ar, *Phe*).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ: 26.1 (β-C- kapronowy); 26.6 (γ-C-*Orn*); 27.4 (γ-C- kapronowy); 30.1 (δ-C- kapronowy); 30.9 (β-C-*Orn*); 34.0, 34.4 (α-C- kapronowy); 34.8, 35.7, 36.1, 36.8, 38.5 (β-C-*Phe*); 39.6 (C przy S Cystamina); 52.8 (α-C-*Phe*); 55.3, 55.9 (α-C-*Orn*); 127.9 (C⁴ *Phe*); 129.6 (C^{2,6} *Phe*); 130.3 (C^{3,5} *Phe*); 136.3 (C¹ *Phe*); 157.8, 158.6, 175.0, 175.6, 175.8 (CONH).

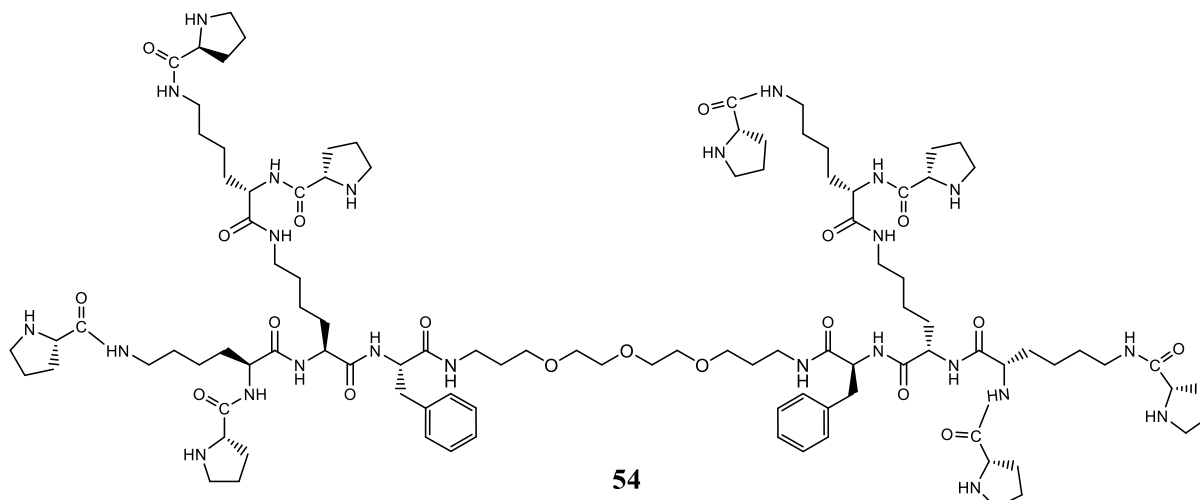
7.2.2 Funkcjonalizacja wybranych rdzeni dendrymerów „bola”

Związek 54



Pierwszy etap syntezy polega na usunięciu grup *t*-butyloksykarbonylowych (Boc) z użyciem nas. HCl/EtOAc i prowadzi do uzyskania dendrymerycznego związku z wolnymi grupami aminowymi **48a**. Następnie Fmoc-Pro-OH (1.3 g, 3.84 mmol), HOSu (0.442 g, 3.84 mmol) oraz DCC (0.824 g, 4 mmol) rozpuszczono w 20 ml THF i mieszano przez noc do uzyskania aktywnego estru. Roztwór estru aktywnego dodano do rozpuszczonego w 10 ml THF związku **48a** (0.3 g, 0.15 mmol) i TEA (0.518 g, 5.12 mmol) i mieszano przez 168 godz. w temperaturze pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Mieszaninę odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto kolejno 5 razy wodnym roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką, wysuszono nad MgSO₄, odfiltrowano i odparowano *in vacuo*. Produkt wstępnie oczyszczono na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, stosując MeOH jako eluent, a następnie na HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05%

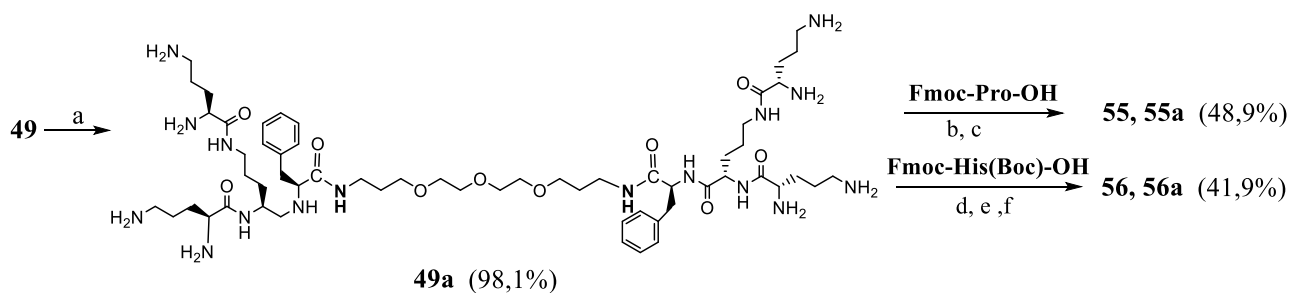
HCl, w przepływie 3.0 m/min. Następnie usunięto zabezpieczenie Fmoc za pomocą 50% roztworu tris(2-aminoetylo)aminy/MeOH. Otrzymano związek **54** z wydajnością 37.4%.



^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.31 - 1.40 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys), 1.41 - 1.45 (m, CH_3 -*t*-Bu), 1.70 - 1.93 (m, γ , β , δ CH_2 -Lys, CH_2 -Pro), 3.00 - 3.05 (m, CH_2 -Phe, ϵ CH_2 -Lys, CH_2 -Pro, NH- CH_2 - łącznik), 3.14 - 3.37 (m, CH_2 -Phe, ϵ - CH_2 -Lys, CH_2 - łącznik), 3.39 - 3.46 (m, α CH-Lys), 3.48 - 3.67 (m, O- CH_2 - łącznik, CH-Pro), 3.90 - 3.96 (m, α CH-Lys), 7.11 - 7.17 (m, Ar-Phe).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 24.4, 28.9, 29.0 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (Boc)]; 26.3(γ -C-Pro); 30.0, 33.9, 38.6 (NH- CH_2 łącznik); 31.7 (β -C-Pro); 38.2 (β -C-Phe); 40.3, 41.2; 48.3 (δ -C-Pro); 52.6, 56.4; 62.4 (α -C-Pro); 69.2, 70.0, 71.4 (O- CH_2 łącznik); 80.0, 80.7 [$\text{C}^{\text{IV}}(\text{CH}_3)_3$ (Boc)]; 154.6, 158.7 [C=O (Boc)]; 174.2, 175.3, 176.0 (CONH).

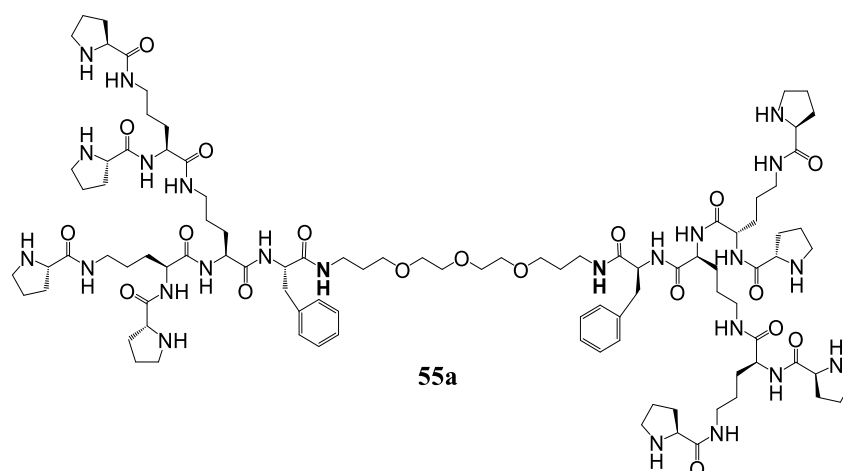
Związek 55a oraz 56a



Związek 55a

Pierwszy etap syntezy polega na usunięciu grup *t*-butyloksykarbonylowych (Boc) z użyciem nas. HCl/EtOAc i prowadzi do uzyskania dendrymerycznego związku z wolnymi grupami aminowymi **49a**. Następnie Fmoc-Pro-OH (1.3 g, 3.84 mmol), HOSu (0.442 g, 3.84 mmol) oraz DCC (0.824 g, 4 mmol) rozpuszczono w 15 ml THF i mieszano przez noc do uzyskania aktywnego estru. Roztwór estru aktywnego dodano do rozpuszczonego w 8 ml THF związku **49a** (0.32 g, 0.16 mmol) i TEA (0.518 g, 5.12 mmol) i mieszano przez 126 godz. w temperaturze

pokojoyej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Mieszaninę odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto kolejno 5 razy wodnym roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką, wysuszono nad MgSO₄, odfiltrowano i odparowano *in vacuo*. Produkt wstępnie oczyszczono na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, stosując MeOH jako eluent, a następnie na HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Następnie usunięto zabezpieczenie Fmoc za pomocą 50% roztworu tris(2-aminoetylo)aminy/MeOH. Otrzymano związek **55a** z wydajnością 48.9%.



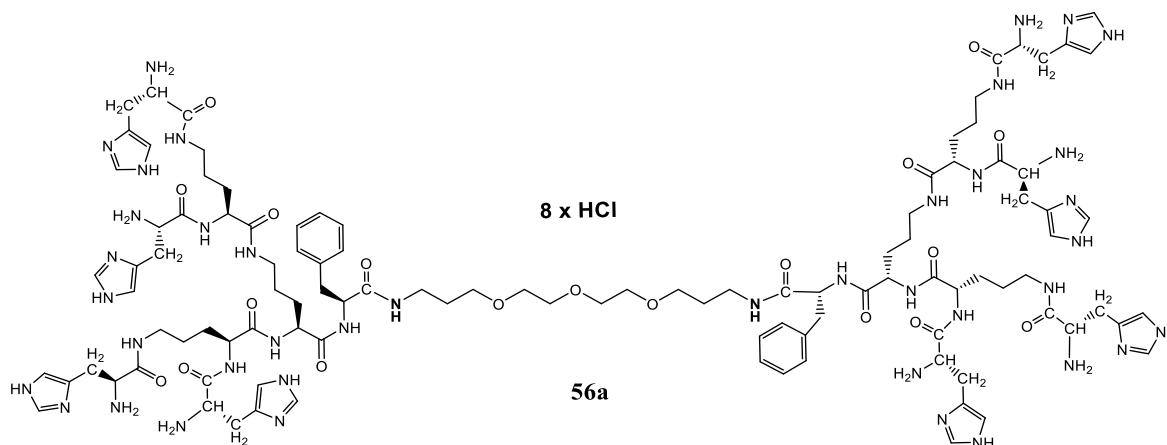
¹H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.50–1.80 (m, CH₂- β , γ -Orn); 1.70–2.20 (m, CH₂-Pro); 2.90–3.06 (m, CH₂-Pro, NH-CH₂- łącznik); 3.00–3.20 (m, CH₂-Phe); 3.24–3.33 (m, CH₂- δ -Orn) 3.43–3.76 (m, O-CH₂- łącznik, CH-Pro); 4.26–4.43 (m, CH- α -Orn, CH- α -Phe); 7.12–7.30 (m, Ar-Phe).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 25.3 (γ -C-Pro); 26.5 (γ -C-Orn); 30.2 (β -C-Orn); 31.9 (β -C-Pro); 37.0 (NH-CH₂ łącznik); 38.4 (β -C-Phe); 38.8 (δ -C-Orn); 47.8 (δ -C-Pro); 54.0 (α -C-Phe); 57.1 (α -C-Orn); 61.3 (α -C-Pro); 69.6 (O-CH₂ łącznik); 71.0, 71.2 (O-CH₂ łącznik); 127.1 (C4Phe); 128.9 (C2,6Phe); 130.5 (C3,5Phe); 139.3 (C1Phe); 173.6 (CONH Phe); 176.9, 177.2, 178.9 (CONH).

Związek 56a

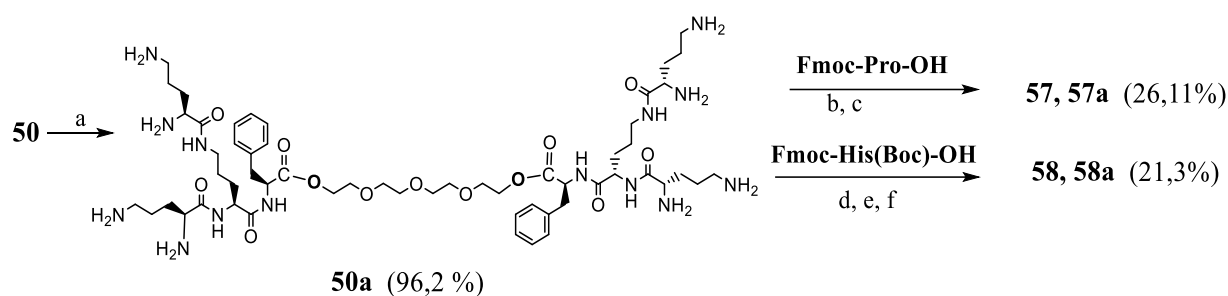
Po usunięciu grup *t*-butyloksykarbonylowych (Boc) ze związku **49** przygotowano ester aktywny histydyny. Ester aktywny histydyny otrzymano przez dodanie do Fmoc-His(Boc)-OH (2.21 g, 3.84 mmol) rozpuszczonej w 15 ml THF, HOSu (0.442 g, 3.84 mmol) i DCC (0.824 g, 4 mmol) i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu zawierającego związek **49a** (0.32 g, 0.16 mmol) oraz TEA (0.518 g, 5.12 mmol) rozpuszczone w 8 ml THF i mieszano 126 h w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu

reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et_3N . Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 i solanką, suszono nad MgSO_4 , przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Następnie dendrymer odbezpieczono usuwając grupy Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyna/MeOH. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na preparatywnej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/ H_2O , z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Otrzymano związek **56a** z wydajnością 41.9%.

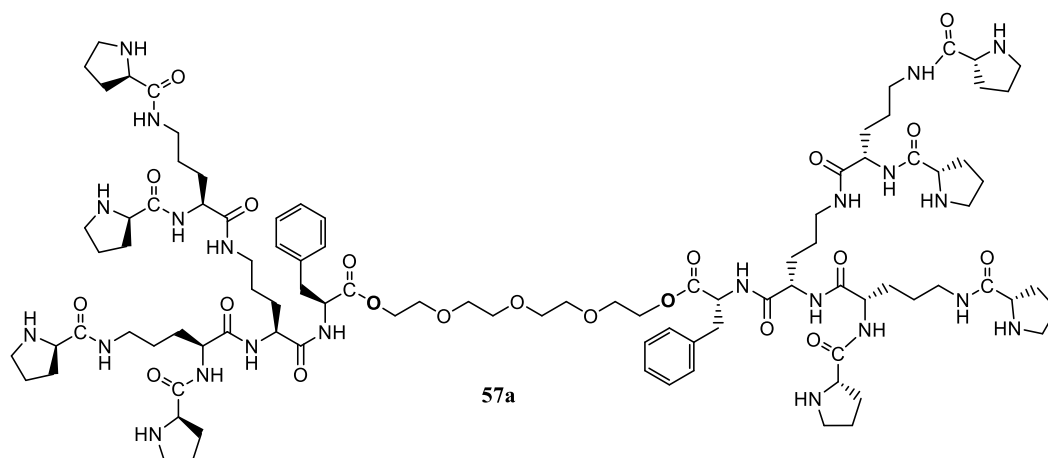


^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ (połowa cząsteczki): 1.38–1.46 (m, CH_3 –Boc); 1.47–1.83 (m, $\text{CH}_2\beta$, γ -Orn); 2.82–3.25 (m, $\text{CH}_2\beta$ -His, δ -Orn, $\text{CH}_2\beta$ -Phe); 3.46–3.67 (m, CH_2 , łącznik); 3.93–4.09 (m, CH α -Orn); 4.09–4.22 (m, $\text{CH}\alpha$ -Phe, α -Orn); 4.45–4.51 (m, CH - α -His); 6.82–6.87 (m, Ar-His); 7.11–7.24 (m, Ar-Phe); 7.56–7.64 (m, Ar-His).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ (połowa cząsteczki): 25.7 (γ -C-Orn); 27.4, 27.5 (γ -C-Orn); 28.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{Boc})$]; 30.1, 30.4, 30.9 (β -C-Orn); 32.5 (β -C-His); 38.3 (δ -C-Orn); 39.1 (β -C-Phe); 39.7 (NH- CH_2 -łącznik); 42.5 (δ -C-Orn); 53.9 (α -C-Phe); 52.2, 52.8, 55.1, 55.2 (α -C-His); 55.9, 56.2 (α -C-Orn); 69.8 (O- CH_2 -łącznik); 71.2, 71.4 (O- CH_2 -łącznik); 79.8 [$\text{C}^{\text{IV}}(\text{CH}_3)_3(\text{Boc})$]; 80.5 [$\text{C}^{\text{IV}}(\text{CH}_3)_3(\text{Boc})$]; 119.2 (C=CH His); 127.3 (C4Phe); 129.1 (C2,6Phe); 130.6 (C3,5Phe); 133.9 (C=CH His); 136.2 (N-HC=N His); 139.5 (C1Phe); 158.4 [C=O (Boc)]; 171.8 (CONH Phe); 172.9, 173.2, 173.3, 173.7, 174.6, 175.5, 177.8 (CONH).

Związek 57a oraz 58a**Związek 57a**

Pierwszy etap syntezy polega na usunięciu grup *t*-butyloksykarbonylowych (Boc) z użyciem nas. HCl/EtOAc i prowadzi do uzyskania dendrymerycznego związku z wolnymi grupami aminowymi **50a**. Następnie Fmoc-Pro-OH (1.3 g, 3.84 mmol), HOSu (0.442 g, 3.84 mmol) oraz DCC (0.824 g, 4 mmol) rozpuszczono w 15 ml THF i mieszano przez noc do uzyskania aktywnego estru. Roztwór estru aktywnego dodano do rozpuszczonego w 8 ml THF związku **50a** (0.3 g, 0.16 mmol) i TEA (0.518 g, 5.12 mmol) i mieszano przez 126 godz. w temperaturze pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Mieszaninę odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto kolejno 5 razy wodnym roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką, wysuszono nad MgSO₄, odfiltrowano i odparowano *in vacuo*. Produkt wstępnie oczyszczono na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, stosując MeOH jako eluent, a następnie na HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Następnie usunięto zabezpieczenie Fmoc za pomocą 50% roztworu tris(2-aminoetylo)aminy/MeOH. Otrzymano związek **57a** z wydajnością 26.11%.

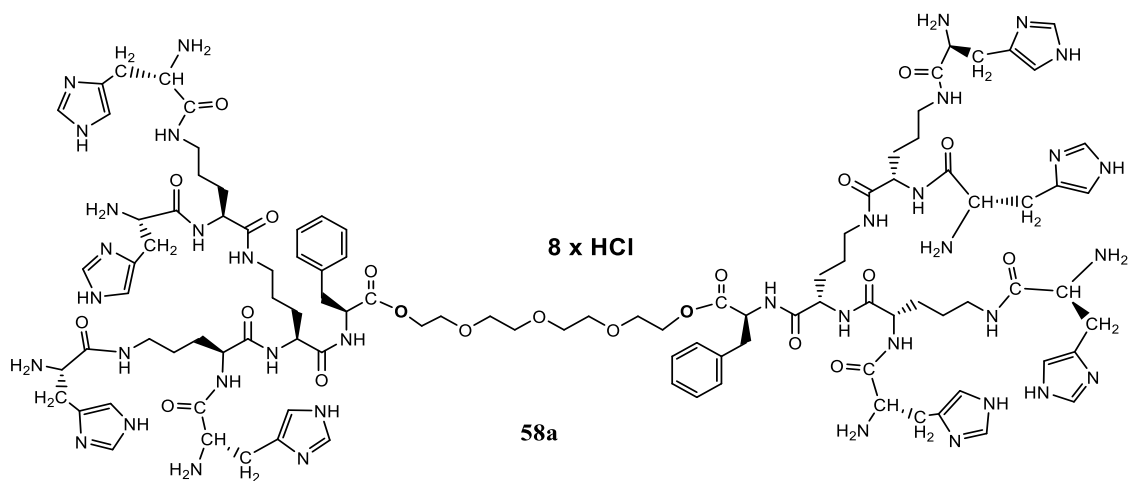


^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.45–1.58 (m, CH_2 - γ -*Orn*); 1.67–2.18 (m, β -*Orn*, CH_2 -*Pro*); 2.89–2.99 (m, CH_2 -*Pro*); 2.98–3.27 (m, CH_2 -*Phe*, CH_2 - δ -*Orn*); 3.53–3.77 (m, O- CH_2 -*Pro*); 4.16–4.47 (m, CH - α -*Orn*, CH - α -*Phe*); 7.11–7.30 (m, Ar-*Phe*).

^{13}C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 26.8 (γ -C-*Pro*); 28.7 (γ -C-*Orn*); 30.4 (β -C-*Orn*); 32.1 (β -C-*Pro*); 38.3 (δ -C-*Orn*); 39.1 (β -C-*Phe*); 39.7 (δ -C-*Orn*); 48.0 (δ -C-*Pro*); 54.3 (α -C-*Orn*); 57.4 (α -C-*Phe*); 61.6, 61.7 (α -C-*Pro*); 71.3, 71.5 (O- CH_2 łącznik); 127.3 (C4*Phe*); 129.2 (C2,6*Phe*); 130.4 (C3,5*Phe*); 139.5 (C1*Phe*); 173.3 (CONH *Phe*); 174.2, 176.8, 177.0, 177.6 (CONH).

Związek 58a

Po usunięciu grup *t*-butyloksykarbonylowych (Boc) ze związku **50** przygotowano ester aktywny histydyny. Ester aktywny histydyny otrzymano przez dodanie do Fmoc-His(Boc)-OH (2.21 g, 3.84 mmol) rozpuszczonej w 15 ml THF, HOSu (0.442 g, 3.84 mmol) i DCC (0.824 g, 4 mmol) i mieszanie przez 12 godz. w temp. pokojowej. Przygotowany ester aktywny dodano do roztworu zawierającego związek **50a** (0.3 g, 0.16 mmol) oraz TEA (0.518 g, 5.12 mmol) rozpuszczone w 8 ml THF i mieszano 126 h w temp. pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 5-krotnie kolejno roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad MgSO₄, przefiltrowano i odparowano do sucha *in vacuo*. Następnie dendrymer odbezpieczono usuwając grupy Fmoc za pomocą 50% roztworu tris(2-aminoetylo)aminy/MeOH. Dendrymeryczny produkt oczyszczono wstępnie metodą chromatograficznego sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie na preparatywnej kolumnie HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Otrzymano związek **58a** z wydajnością 21.3%.



^1H NMR (600 MHz, MeOD), δ : 1.12–1.83 (m, $\text{CH}_2\beta, \gamma\text{-Orn}$); 3.31–3.38 (m, $\text{CH}_2\beta\text{-His}, \delta\text{-Orn}, \text{CH}_2\beta\text{-Phe}$); 3.40–3.47 (m, CH $\alpha\text{-Orn}$); 3.48–3.57 (m, $\text{CH}_2\text{-}\delta\text{-Orn}$); 3.59–3.61 (m, $\text{CH}_2\text{-}$ łącznik); 3.63–3.66 (m, CH $\alpha\text{-Orn}$); 3.67–3.72 (m, $\text{CH}_2\text{-}$ łącznik); 4.21–4.28 (m, CH- $\alpha\text{-His}$); 7.36–7.40 (m, Ar-*Phe*); 7.52–7.55 (m, Ar-*His*); 8.93–8.96 (m, Ar-*His*).

^{13}C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ : 25.4 ($\gamma\text{-C-Orn}$); 26.0, 26.6 ($\beta\text{-C-Orn}$); 27.7 ($\delta\text{-C-Orn}$); 44.1, 45.9 ($\beta\text{-C-His}$); 48.1 ($\beta\text{-C-Phe}$); 49.8, 50.2 ($\delta\text{-C-Orn}$); 53.4 ($\alpha\text{-C-Phe}$); 52.1, 55.5 ($\alpha\text{-C-Orn}$); 60.5, 61.9 ($\alpha\text{-C-His}$); 71.0, 71.3, 73.4 (O- $\text{CH}_2\text{-}$ łącznik); 119.7 (C=CH His); 127.2 (C₄Phe); 128.7 (C_{2,6}Phe); 129.7 (C_{3,5}Phe); 134.5 (C=CH His); 135.6 (N-HC=N His); 137.8 (C₁Phe); 167.9 (CONH Phe); 172.2, 173.2, 174.2, 177.1, 177.2, 177.4 (CONH).

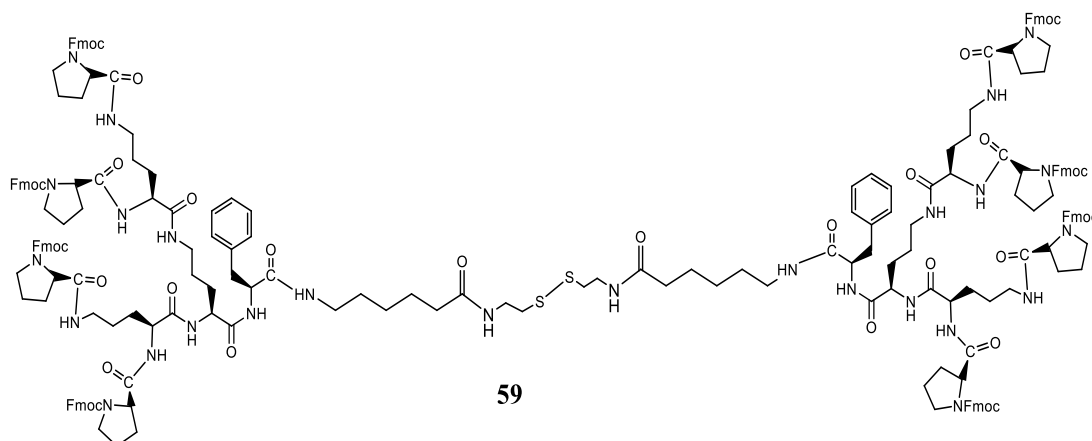
Synteza sfunkcjonalizowanego siarkowego dendrymeru „bola”

Związek 59

Pomimo prób podjęcia syntez, nie udało uzyskać się w pełni czystego związku.

Pierwszy etap syntezy polega na usunięciu grup *tert*-butyloksykarbonylowych (Boc) z użyciem nas. HCl/EtOAc i prowadzi do uzyskania dendrymerycznego związku z wolnymi grupami aminowymi **53a**. Następnie Fmoc-Pro-OH (0.56 g, 1.67 mmol), HOSu (0.192 g, 1.67 mmol) oraz DCC (0.379 g, 184 mmol) rozpuszczono w 15 ml THF i mieszano przez noc do uzyskania aktywnego estru. Roztwór estru aktywnego dodano do rozpuszczonego w 10 ml THF związku **53a** (0.15 g, 0.069 mmol) i TEA (0.518 g, 5.12 mmol) i mieszano przez 264 godz. w temperaturze pokojowej. Wartość pH podczas przebiegu reakcji sprzęgania była kontrolowana. Ponadto, obserwowano spadek wartości pH poniżej 10 po 24h i dodawano do mieszaniny reakcyjnej kolejne nadmiary Et₃N. Mieszaninę odparowano a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto kolejno 5 razy wodnym roztworem 5% kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką, wysuszono nad MgSO₄, odfiltrowano i odparowano *in vacuo*. Produkt wstępnie oczyszczono na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, stosując MeOH jako eluent, a następnie na semipreparatywnym HPLC w gradiencie od 5 do 95% MeOH/H₂O, z dodatkiem 0.05% HCl, w przepływie 3.0 ml/min. Według profilu analitycznego HPLC uzyskano mieszaninę związków, których nie mogłem rozdzielić również po zmianie układu rozpuszczalników (MeCN/H₂O).

Poniżej przedstawiono strukturę planowanego związku **59** zawierającego mostek disiarczkowy.



Zakresy NMR dla wybranych sygnałów

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ : 1.38 – 2.42 (m, β , γ - CH_2 -Orn, CH_2 -Pro, CH_2 - łącnik), 2.35 – 2.69 (S- CH_2 Cystamina) 2.87 – 3.37 (m, δ - CH_2 -Orn, CH_2 -Phe, CH_2 -Pro, N- CH_2 -Cystamina), 3.48 – 3.75 (m, CH-Pro, CH_2 -Pro), 3.77 – 3.92 (m, CH_2 -Fmoc), 3.96 – 4.20 (m, CH-Fmoc), 4.22 – 4.46 (m, α -CH-Orn), 4.54 – 4.69 (m, CH-Phe), 7.12 – 7.41 (m, Ar-Phe, Ar-Fmoc), 7.53 – 7.62 (m, Ar-Fmoc), 7.73 – 7.81 (m, Ar-Fmoc).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD), δ : 25.7, 25.9, 26.4, 26.7, 28.6, 30.4, 30.7, 31.0, 32.0, 38.4, 39.3, 39.7, 40.3, 41.0, 45.7, 47.4, 47.8, 54.3, 55.3, 66.3, 66.4, 67.7, 69.2, 120.9, 125.8, 126.0, 127.9, 128.3, 129.6, 130.4, 138.2, 142.4, 142.5, 156.3, 173.2, 174.4, 175.2.

Tabela 3. Wyniki badań FRAP i ABTS dla związków **1-10**.

Związek	FRAP		ABTS	
	$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$	$\mu\text{mol Trx}/\text{l}$	$\mu\text{mol Trx}/\text{l}$	IC ₅₀
1	4,17 ±0,46	3,05 ±0,34	1,02 ±0,10	38,46
2	14,87 ±0,28	10,88 ±0,20	5,44 ±0,52	20,19
3	20,51 ±0,54	15,01 ±0,40	14,36 ±1,35	11,05
4	11,67 ±0,32	8,54 ±0,24	8,36 ±0,74	15,79
5	27,94 ±0,59	20,45 ±0,43	5,72 ±0,55	21,96
6	18,74 ±0,56	13,71 ±0,41	10 ±0,81	9,16
7	12,84 ±0,56	9,4 ±0,41	0,36 ±1,47	38,46
8	31,37 ±0,43	25,08 ±0,37	8,72 ±0,72	14,22
9	20,74 ±0,39	15,84 ±0,39	13,75 ±0,92	16,08
10	6,55 ±0,41	4,37 ±0,39	2,74 ±0,26	9,84

Tabela 4. Wyniki aktywności antyoksydacyjnej wykonanych polifunkcyjnych dendrymerów według metody FRAP (Ferric reducing antioxidant power) w porównaniu do aminokwasów His i Pro (TEAC).

Związki	TEAC		
	Stężenie dendrymeru (μM)		
	3.85 μM	7.69 μM	15.38 μM
Histydyna	0,38 ± 0,01	0,63 ± 0,04	1,18 ± 0,04
56a	13,13 ± 0,18	26,83 ± 0,26	61,43 ± 0,62
58a	7,78 ± 0,18	17,07 ± 0,14	36,82 ± 0,52

Prolina	0,07 ± 0,01	0,56 ± 0,11	1,35 ± 0,04
55a	0,52 ± 0,04	2,88 ± 0,10	5,26 ± 0,19
57a	1,50 ± 0,06	5,74 ± 0,00	11,86 ± 0,19

Tabela 5. Wyniki aktywności antyoksydacyjnej polifunkcyjnych dendrymerów wykonanych metodą CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) w porównaniu do aminokwasów His i Pro (TEAC).

TEAC

Związki	Stężenie dendrymeru (µM)			
	3.85 µM	7.59 µM	11.54 µM	15.38 µM
Histydyna	0,18 ± 0,00	1,26 ± 0,12	1,35 ± 0,09	2,79 ± 0,15
56a	11,98 ± 1,20	22,46 ± 1,20	32,34 ± 1,26	37,49 ± 1,26
58a	2,84 ± 0,69	7,88 ± 0,75	13,69 ± 0,51	26,53 ± 0,24
Prolina	4,16 ± 1,23	5,39 ± 0,84	6,05 ± 1,26	8,48 ± 2,90
55a	5,57 ± 0,54	8,09 ± 0,66	11,38 ± 0,42	13,51 ± 0,33
57a	10,81 ± 0,63	16,62 ± 0,75	26,14 ± 0,93	32,88 ± 1,20

Tabela 6. Wyniki zdolności wyłapywania kationowych wolnych rodników wykonanych metodą ABTS (Radical scavenging assay) polifunkcyjnych dendrymerów w porównaniu do aminokwasów His i Pro (TEAC).

TEAC

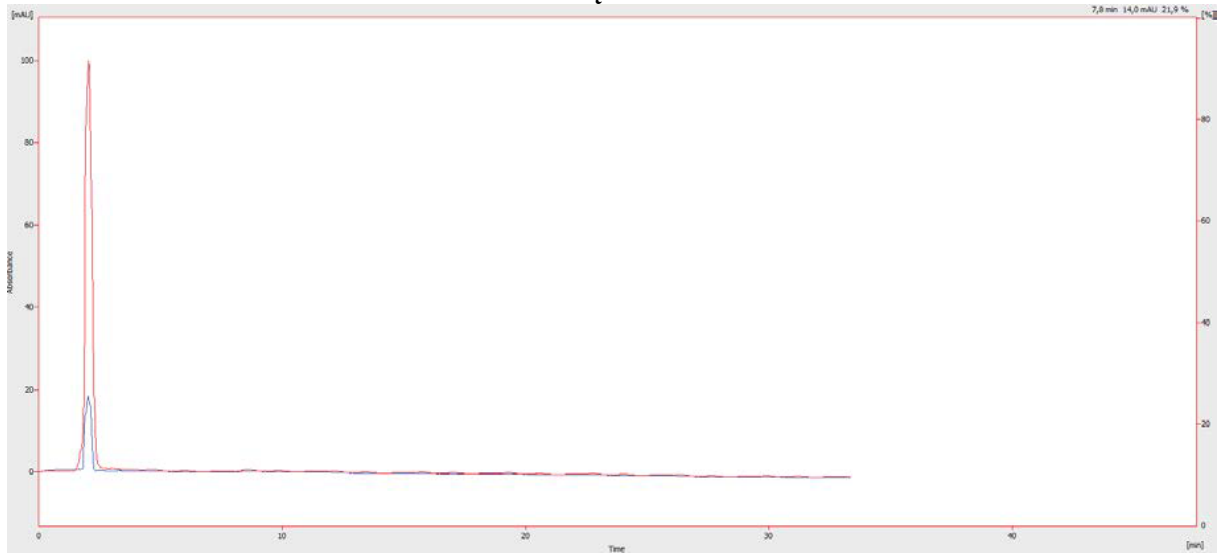
Związki	Stężenie dendrymeru (µM)			
	3.85 µM	7.69 µM	11.54 µM	15.38 µM
Histydyna	0,49 ± 0,09	0,55 ± 0,15	0,58 ± 0,12	0,87 ± 0,13
56a	0,74 ± 0,03	1,86 ± 0,15	2,54 ± 0,12	4,02 ± 0,19
58a	0,28 ± 0,08	1,02 ± 0,12	1,92 ± 0,22	3,08 ± 0,32
Prolina	1,22 ± 0,36	1,42 ± 0,21	1,54 ± 0,25	1,90 ± 0,32
55a	2,20 ± 0,25	5,89 ± 0,33	10,46 ± 0,36	12,54 ± 0,27
57a	3,43 ± 0,08	9,85 ± 0,28	16,52 ± 0,46	21,90 ± 0,69

Tabela 7. Wyniki aktywności przeciwutleniającej dendrymerów wykonanych metodą DPPH (Total free radical scavenging assay) polifunkcyjnych dendrymerów w porównaniu do aminokwasów His i Pro (TEAC).

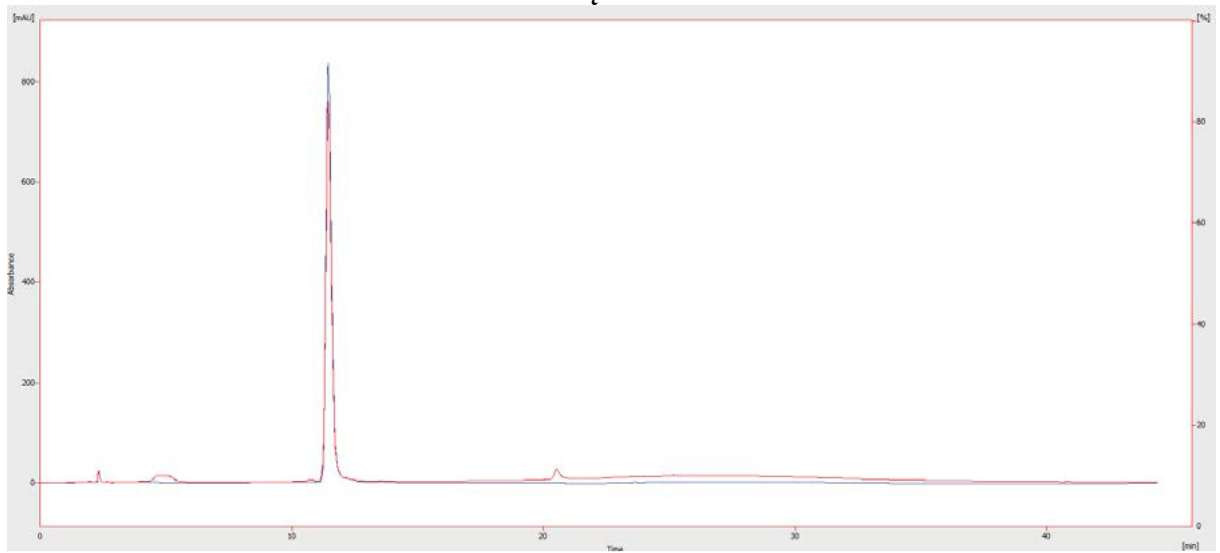
Związki	DPPH			
	Stężenie dendrymeru (μM)			
	3.85 μM	7.69 μM	11.54 μM	15.38 μM
Histydyna	0,98 \pm 0,09	1,50 \pm 0,09	1,50 \pm 0,13	1,62 \pm 0,12
56a	7,77 \pm 0,77	8,91 \pm 0,82	9,85 \pm 0,86	10,44 \pm 0,09
58a	1,17 \pm 0,27	2,65 \pm 0,29	3,29 \pm 0,21	4,05 \pm 0,17
Prolina	5,98 \pm 0,79	7,38 \pm 0,81	7,40 \pm 0,79	7,47 \pm 0,83
55a	2,27 \pm 0,20	3,33 \pm 0,22	4,07 \pm 0,10	4,23 \pm 0,10
57a	2,37 \pm 0,05	6,12 \pm 0,29	9,35 \pm 0,60	10,05 \pm 0,66

Widma analityczne HPLC docelowych związków

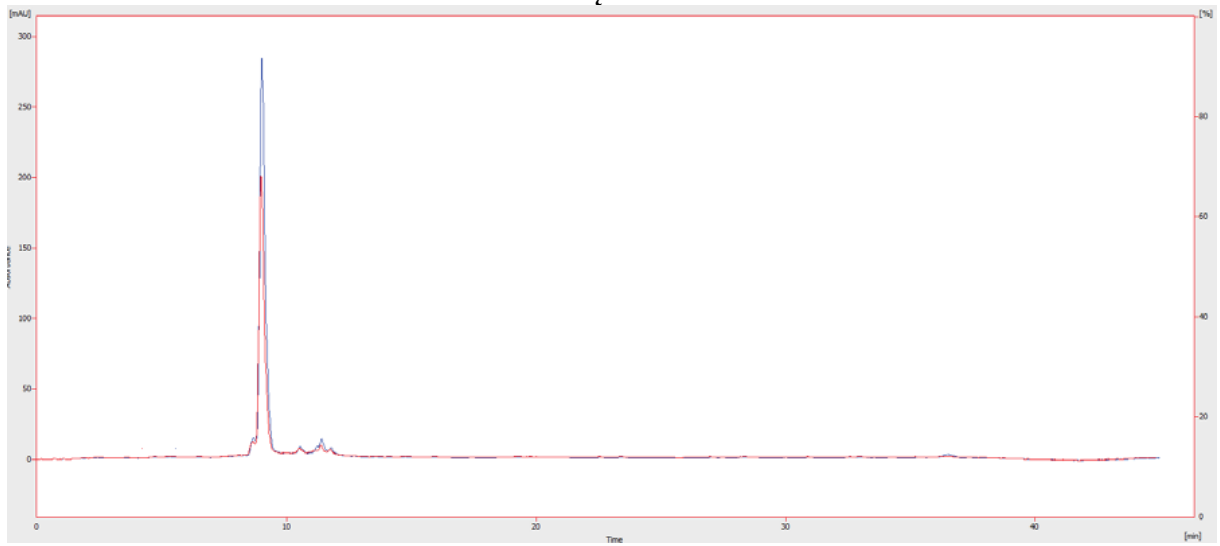
Związek 33



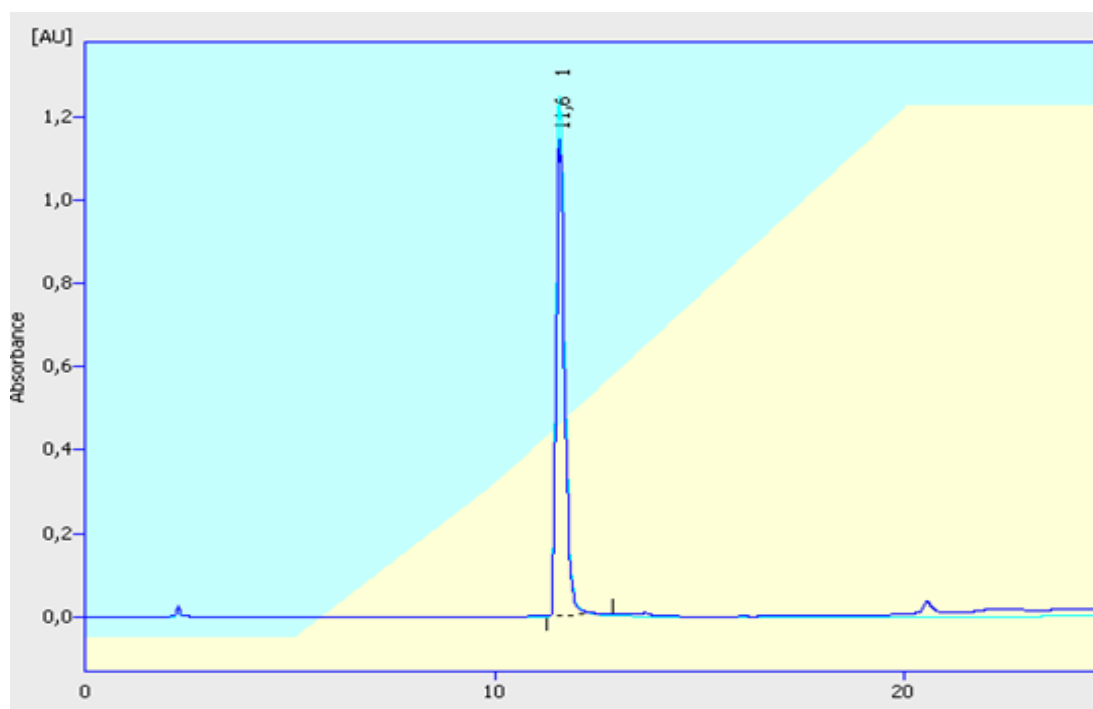
Związek 43



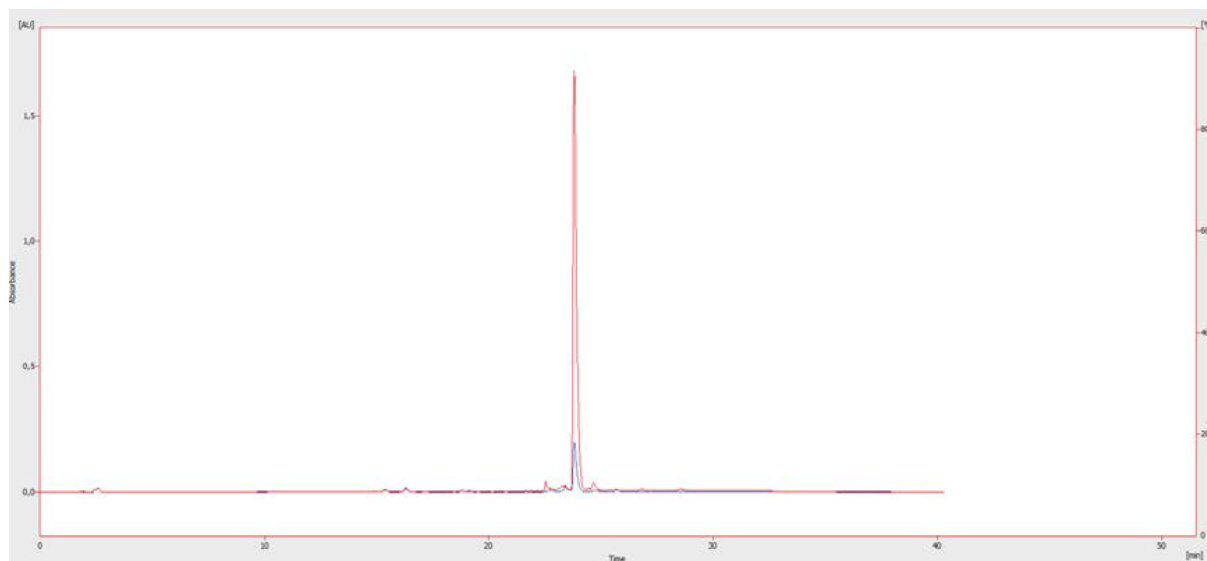
Związek 44



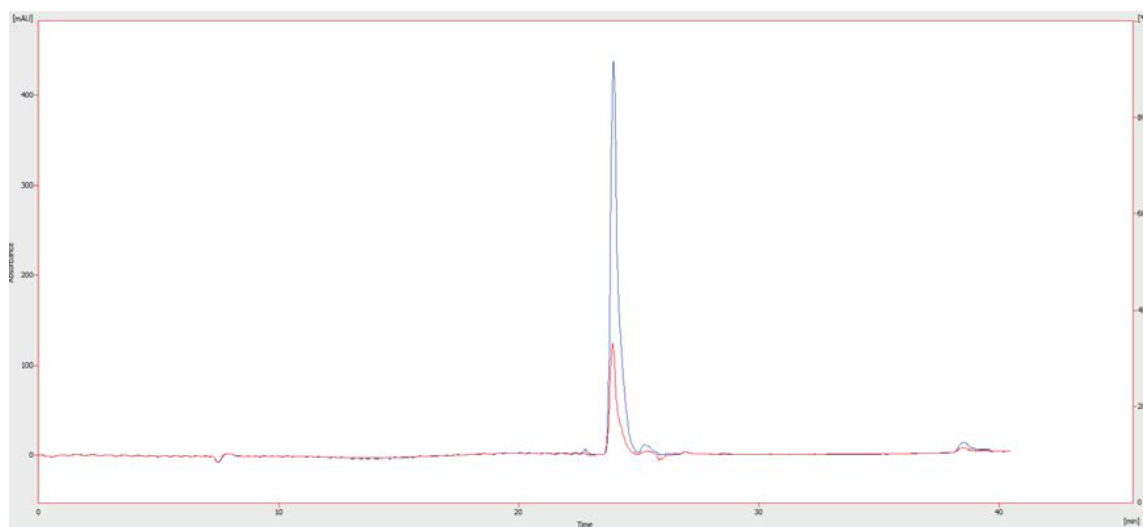
Związek 47



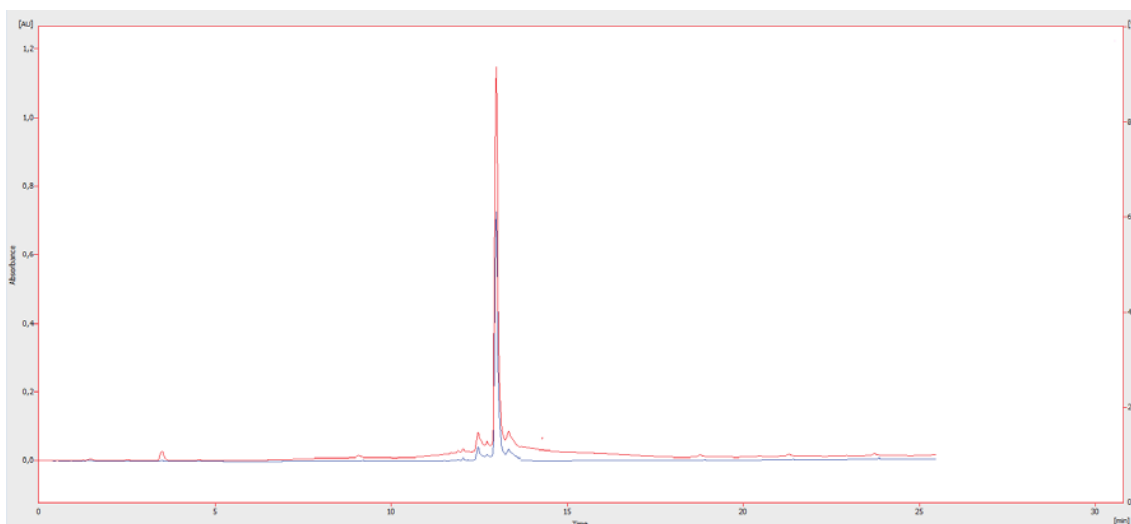
Związek 55



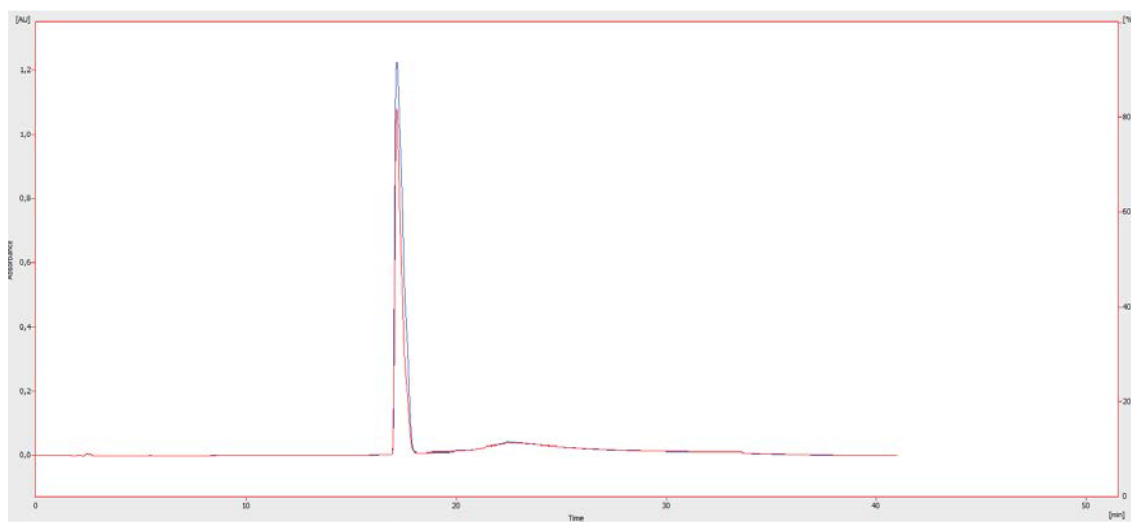
Związek 56a



Związek 57a



Związek 58a



LITERATURA

- [1] Buhleier E., Wehner W., Vögtl F.: „Cascade” and „Nonskid-Chainlike” syntheses of molecular cavity and topologies. *Synthesis*, 1978; 2: 155–158.
- [2] Tomalia D.A., Baker H., Dewald J.R., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P.: A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polym. J.*, 1985; 17: 117–132.
- [3] Newkome G.R., Yao Z.Q., Baker G.R., Gupta V.K.: Cascade molecules: A new approach to micelles, *A[27]-arborol. J. Org. Chem.*, 1985; 50: 2003–2006.
- [4] Chungkyun K., Hong H. J.: Carbosilane and Carbosiloxane Dendrimers, *Molecules*, 2009, 14 (9), 3719-3730.
- [5] Caminade A.M., Maraval V., Laurent R., Turrin C.O., Sutra P., Leclaire J., Griffe L., Marchand P., Baudoin-Dehoux C., Rebout C., Majoral J.P., Phosphorus dendrimers: from synthesis to applications, *Comptes Rendus Chimie*, 2003, tom 6 (8–10), 791-801, ISSN 1631-0748,
- [6] Idris A. O., Mamba B., Feleni U., Poly(propylene imine)dendrimer: A potential nanomaterial for electrochemical application, *Materials Chemistry and Physics*, 2020, tom 244, 122641, ISSN 0254-0584.
- [7] W. Bruce Turnbull, J. Fraser Stoddart Design and synthesis of glycodendrimers, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2002, tom 90, 3–4, 231-255, ISSN 1389-0352.
- [8] R. Sapra, R. P. Verma, G. P. Maurya, S. Dhawan, J. Babu, V. Haridas, Designer Peptide and Protein Dendrimers: A Cross-Sectional Analysis *Chem. Rev.*, 2019, 119, 21, 11391–11441.
- [9] M. Sowinska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Advances in the chemistry of dendrimers, *New J.Chem.*, 2014, 38, 2168.
- [10] D. A Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polymer Journal*, 1985, tom 17, Nr 1, 117-132.
- [11] S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications *Chem. Rev.*, 2001, 101, 12, 3819–386.
- [12] J. Thundimadathil, Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects, *Journal of Amino Acids*, 2012, tom 2012, ID 967347.
- [13] Majoros I.J., Myc A., Thomas T., Mehta C.B.; Baker J.R., PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality *BIOMACROMOLECULES*, 2006, tom 7, 2, 572-579.
- [14] Misselwitz, B., Schmitt-Willich H., Ebert W., Frenzel T., Weinmann H.J., Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent, *Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine*, 2011, tom 12, 2-3, 128-134.
- [15] Dong Q., Hurst D.R., Weinmann H.J., Chenevert T.L., Lundy F.J., Prince M.R., Magnetic resonance angiography with gadomer-17 - An animal study original investigation *Investigative Radiology*, 1998, tom 33, 9, 699-708.
- [16] Wilhelm S.M., Dumas J., Adnane L., Lynch M., Carter C.A., Schutz G., Thierauch K.H., Zopf D., Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity, *International Journal Of Cancer*, 2011, tom 129, 1, 245-255.
- [17] McCarthy T.D., Karellas P., Henderson S.A., Giannis M., O'Keefe D.F., Heery G., Paull J.R.A., Matthews B.R., Holan G., Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention, *Molecular Pharmaceutics*, 2005, tom 2, 4, 312-318.
- [18] Rupp R., Rosenthal S.L., Stanberry L.R., VivaGel (TM) (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer microbicide for the prevention of HIV and HSV infection, *International Journal Of Nanomedicine*, 2007, tom 2, 4, 561-566.
- [19] S.S. Santos, R.V. Gonzaga, J.V. Silva, D.F. Savino, D. Prieto, J.M. Shikay, R.S. Silva, L.H.A. Paulo, E.I. Ferreira, J. Giarolla, Peptide dendrimers: drug/gene delivery and other approaches, *Canadian Journal of Chemistry*, 2017, tom 95, 9.

-
- [20] Jose M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Advances*, 2014, 4, 32658-32672.
- [21] Synteza peptydów na nośniku stałym metodą Fmoc/tBu, Uniwersytet Gdański, dostęp 29.01.22, dostępny na stronie: https://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/10073/files/chembiol_cw1_2.pdf
- [22] Wu J., Huang W., He Z., Dendrimers as Carriers for siRNA Delivery and Gene Silencing: A Review, Hindawi Publishing Corporation, *The Scientific World Journal*, 2013.
- [23] L. Palmerston Mendes, J. Pan, V. P Torchilin, Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy, *Molecules*, 2017, 22, 1401.
- [24] Janiszewska, J., Posadas I, Játiva P, Bugaj-Zarebska M, Urbanczyk-Lipkowska Z. i wsp., Second Generation Amphiphilic Poly-Lysine Dendrons Inhibit Glioblastoma Cell Proliferation without Toxicity for Neurons or Astrocytes, *PLOS ONE*, 2016, 11(11): e0165704.
- [25] J. Janiszewska, M. Sowińska, A. Rajnisz, J. Solecka, I. Łącka, S. Milewski, Z. Urbańczyk-Lipkowska, Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, tom 22, 3, 1388-1393, ISSN 0960-894X.
- [26] Han S., Baigude H., Hattori K., Yoshida T., Uryu T., Synthesis of New Spherical and Hemispherical Oligosaccharides with Polylysine Core Scaffold, *Carbohydr. Polym.*, 2007, 68, 26–34.
- [27] W. Suh, J. K. Chung, S. H. Park, S. W. Kim, Anti-JL1 antibody-conjugated poly(L-lysine) for targeted gene delivery to leukemia T cells, *J. Control. Release*, 2001, 72, 171-178.
- [28] T. N. Siriwardena, i wsp., Lipidated Peptide Dendrimers Killing Multidrug-Resistant Bacteria, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140, 423–432.
- [29] Janiszewska J., Z. Urbanczyk-Lipkowska, Amphiphilic dendrimeric peptides as model non-sequential pharmacophores with antimicrobial properties, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 13(4), 220-5.
- [30] Sowińska M. i wsp., Bioinspired Amphiphilic Peptide Dendrimers as Specific and Effective Compounds against Drug Resistant Clinical Isolates of *E. coli*, *Bioconjug. Chem.*, 2018, 29(11), 3571-3585.
- [31] Zielińska P. i wsp., Design and studies of multiple mechanism of anti-Candida activity of a new potent Trp-rich peptide dendrimers, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 105, 106-19.
- [32] Staniszevska M. i wsp., The in vitro effects of new D186 dendrimer on virulence factors of *Candida albicans*, *The Journal of Antibiotics*, 2014, 67(6), 425-432.
- [33] Naldini L., Gene therapy returns to centre stage, *Nature*, 2015, 526, 351–360.
- [34] Zeng H., Johnson M.E., Oldenhuis N.J., Tiambeng T.N., Guan Z., Structure-based design of dendritic peptide bolaamphiphiles for siRNA delivery, *ACS Cent. Sci.*, 2015, 1:303–312.
- [35] Valentine D. L., Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, 5, 316–323.
- [36] HW. Tian, Y. Cen Liu i D.S. Guo, Assembling features of calixarene-based amphiphiles and supra-amphiphiles, *Mater. Chem. Front*, 2020, 1.
- [37] Y. Yao, X. Chi, Y. Zhou i F. Huang, A bola-type supra-amphiphile constructed from a water-soluble pillar[5]arene and a rod-coil molecule for dual fluorescent sensing, *Chem. Sci.*, 2014, 5, 2778.
- [38] Z. Huang, D. M. Zhao, X. Deng, J. Zhang, Y.M. Zhang i X.Q. Yu, Functionalized Asymmetric Bola-Type Amphiphiles for Efficient Gene and Drug Delivery, *Nanomaterials*, 2018, 8, 115.
- [39] Ropponen J., Nummelin S., Rissanen K., Bisfunctionalized Janus molecules, *Organic letters*, 2004, tom 6, 15, 2495-2497.
- [40] Percec V., Wilson D.A., Leowanawat P., Wilson C.J., Hughes A.D., Kaucher M.S., Hammer D.A., Levine D.H., Kim A.J., Bates F.S., Davis K.P., Lodge T.P., Klein M.L., DeVane R.H., Aquad E., Rosen B.M., Argintaru A.O., Sienkowska M.J., Rissanen K., Nummelin S. I., Ropponen J., Self-assembly of Janus-dendrimers into Uniform Dendrimersomes and Other Complex Architectures, *Science*, 2010, tom 328, 5981, 1009-1014.
- [41] Percec V.; Imam M.R.; Bera T.K. i wsp., Self-assembly of semifluorinated janus-dendritic benzamides into bilayered pyramidal columns, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2005, tom 44, 30, 4739-4745.
- [42] Sun H.J., Zhang, S., Percec V., From structure to function via complex supramolecular dendrimer systems, *chemical Society Reviews*, 2015, tom 44, 12, 3900-3923.

-
- [43] Caminade A.M., Laurent R., Delavaux-Nicot B., Majoral J.P., Janus dendrimers: syntheses and properties, *New Journal Of Chemistry*, 2012, tom 36, 2, 217-226.
- [44] L. Degoricija, M. A. Carnahan, C. S. Johnson, T. Kim, M.W. Grinstaff, Synthesis and Characterization of Bola-Type Amphiphilic Dendritic, *Macromolecules*, 2006, 39, 26, 8952–8958.
- [45] Yu T. i wsp., An Amphiphilic Dendrimer for Effective Delivery of Small Interfering RNA and Gene Silencing In Vitro and In Vivo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 1 – 7.
- [46] X.Liu i wsp. A Fluorinated Bola-Amphiphilic Dendrimer for On-Demand Delivery of siRNA, via Specific Response to Reactive Oxygen Species, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, tom 26, 47, 8594-8603.
- [47] Zeng H., Johnson M.E., Oldenhuis N.J., Tiambeng T.N., Guan Z., Structure-Based Design of Dendritic Peptide Bolaamphiphiles for siRNA Delivery, *ACS Cent Sci.*, 2015, 1(6), 303-312.
- [48] A. C. Eldredge i wsp., Focused Library Approach to Discover Discrete Dipeptide Bolaamphiphiles for siRNA Delivery, *Biomacromolecules*, 2016, 17, 10, 3138–3144.
- [49] A. Santos, F. Veiga, A. Figueiras, Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications, *Materials*, 2020, 13, 65.
- [50] Zhang J., Malcolm F. G. S., Tracey D. B., Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance, *Curr. Mol. Pharmacol.*, 2012, 5, 102–114.
- [51] Wang Y., Stevens M. F. G., Chan T.M., DiBenedetto D., Ding Z.X., Gala D., Hou D., Kugelman M., Leong W., Kuo S.C., Mas J. L., Schumacher D. P., Shutts B. P., Smith L., Zhan Z.Y. J., Thomson W. T., Antitumor Imidazotetrazine. 35. New Synthetic Routes to the Antitumor Drug Temozolomide, *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 21, 7288–7294.
- [52] Ostrom Q. T., Gittleman H., Fulop J., Liu M., Blanda R., Kromer C., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. S., CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012, *NeuroOncology*, 2015, 17, iv1–iv62.
- [53] Ugir Hossain Sk, Sumit Kumar Hira, Abhinandan Rej, Debapriya RoyMahapatra, Partha Pratim Manna, Development of a PAMAM Dendrimer for Sustained Release of Temozolomide against Experimental Murine Lymphoma: Assessment of Therapeutic Efficacy, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2021, 4, 2628–2638.
- [54] Zhang H., Gao S., Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against glioma C6 cancer cells in vitro, *Int J Pharm.*, 2007, 329(1–2), 122–128.
- [55] Hu J., Wang J., Wang G., Yao Z., Dang X., Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells, *Int. J. Mol. Med.*, 2016, 37(3), 690–702.
- [56] C.Y. Lee, Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment, *OncoTargets and Therapy*, 2017, 10, 265–270.
- [57] S. M. Ward, M. Skinner, B. Saha, i T. Emrick, Polymer–Temozolomide Conjugates as Therapeutics for Treating Glioblastoma, *Mol. Pharmaceutics*, 2018, 15, 5263–5276.
- [58] K. Prashant, A. K. Iyer, Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery, *Drug discovery today*, 2015, tom 20, 5, 536-47.
- [59] Zhao J., Zhang B., Shen S., Chen J., Zhang Q., Jiang X., Pang Z., CREKA peptide-conjugated dendrimer nanoparticles for glioblastoma multiforme delivery, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, 450, 396–403.
- [60] Van Woensel M.; Wauthoz N.; Rosiere R.; Mathieu V.; Kiss R.; Lefranc F.; Steelant B.; Dilissen E.; Van Gool S. W.; Mathivet T.; Gerhardt H.; Amighi K.; De Vleeschouwer S., Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration, *J. Control Release*, 2016, 227, 71-81.
- [61] Sadler K., Tam JP., Peptide dendrimers: applications and synthesis, *J. Biotechnol.*, 2002, 90, 3–4, 195–229.
- [62] Serramia M. J.; Alvarez S.; Fuentes-Paniagua E.; Clemente M. I.; Sanchez-Nieves J.; Gomez R.; de la Mata J.; Munoz-Fernandez M. A., In vivo delivery of siRNA to the brain by carbosilane dendrimer, *J. Control Release*, 2015, 200, 60-70.
- [63] Catalá-López F., Hutton B., Driver J.A. i wsp., Cancer and central nervous system disorders: protocol for an umbrella review of systematic reviews and updated meta-analyses of observational studies, *Syst. Rev.* 6, 2017, 69.

-
- [64] V. Leiro, S. Duque Santos, C. D. F. Lopes, A. P. Pêgo, Dendrimers as Powerful Building Blocks in Central Nervous System Disease: Headed for Successful Nanomedicine, *Advanced Functional Materials Solutions to Engineering the Neural Interface*, 2017, tom 28, 12.
- [65] B. Obermeier, R. Daneman, R. M. Ransohoff, Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier, *Nat. Med.*, 2013, 19, 1584.
- [66] W. A. Banks, Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier, *BMC Neurol.*, 2009, tom 9, 1.
- [67] S. Mignani, M. Bryszewska, M. Zablocka, B. Klajnert-Maculewicz, J. Cladera, D. Shcharbin, J.-P. Majoral, Can dendrimer based nanoparticles fight neurodegenerative diseases? Current situation versus other established approaches, *Prog. Polym. Sci.*, 2017, 64, 23.
- [68] Eaton M.A.W., Levy L., Fontaine O.M.A., Delivering nanomedicines to patients: A practical guide, *Nanomedicine*, 2015, 11, 983-992.
- [69] P. Jeon, M. Choi, J. Oh, M. Lee, Dexamethasone-Conjugated Polyamidoamine Dendrimer for Delivery of the Heme Oxygenase-1 Gene into the Ischemic Brain, *Macromol. Biosci.*, 2015, 15, 1021.
- [70] N. H. Gamage, L. Jing, M. J. Worsham, M. M. Ali, Targeted Theranostic Approach for Glioma Using Dendrimer-Based Curcumin Nanoparticle, *Nanomed. Nanotechnol.*, 2016, 7, 4, 393.
- [71] S. Somani, D. R. Blatchford, O. Millington, M. L. Stevenson, C. Dufes, Transferrin-bearing polypropylenimine dendrimer for targeted gene delivery to the brain, *J. Controlled Release*, 2014, 188, 78.
- [72] I. M. Neelov, A. Janaszewska, B. Klajnert, M. Bryszewska, N. Z. Makova, D. Hicks, H. A. Pearson, G. P. Vlasov, M. Y. Ilyash, D. S. Vasilev, N. M. Dubrovskaya, N. L. Tumanova, I. A. Zhuravin, A. J. Turner, N. N. Nalivaeva, Application of new lysine-based peptide dendrimers D3K2 and D3G2 for gene delivery: Specific cytotoxicity to cancer cells and transfection in vitro, *Curr. Med. Chem.*, 2013, 20, 134.
- [73] I. Neelov, A. Janaszewska, B. Klajnert, M. Bryszewska, N.Z. Makova, D. Hicks, H.A. Pearson, G.P. Vlasov, M.Y. Ilyash, D.S. Vasilev, N.M. Dubrovskaya, N.L. Tumanova, I.A. Zhuravin, A.J. Turner, N.N. Nalivaeva, Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with A β -peptides and neuronal cells, *Current Med. Chem.*, 2013, 20, 1, 134-143.
- [74] M. J. Serramia, S. Alvarez, E. Fuentes-Paniagua, M. I. Clemente, J. Sanchez-Nieves, R. Gomez, J. de la Mata, M. A. Munoz-Fernandez, In vivo delivery of siRNA to the brain by carbosilane dendrimer, *J. Controlled Release*, 2015, tom 200, 60-70.
- [75] A.M. Caminade, Poly(phosphorhydrazone) Dendrimers and Other Phosphorus-containing Dendrimers, M. Malkoch, S. Garcia Gallego, *Dendrimer Chemistry: Synthetic Approaches Towards Complex Architectures*, Royal Society of Chemistry, 2020, 146-182, 978-1-78801-132-7. [ff10.1039/9781788012904-00146ff](https://doi.org/10.1039/9781788012904-00146ff). [ffhal-02880003f](https://doi.org/10.1039/9781788012904-00146ff).
- [76] Z.Zhao-Hui, L. Ming-Tseh, C. Liam, *Molecular Advances in Diagnosis and Treatment of CNS Tumors*, *Frontiers in Oncology*, 2020, 10, 1903.
- [77] Riedl S.; Rinner B.; Asslaber M.; Schaidler H.; Walzer S.; Novak A.; Lohner K.; Zwegtich D., In search of a novel target—Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.*, 2011, 1808, 2638–2645.
- [78] Riedl S.; Rinner B.; Schaidler H.; Lohner K.; Zwegtich D., Killing of melanoma cells and their metastases by human lactoferricin derivatives requires interaction with the cancer marker phosphatidylserine, *Biomaterials*, 2014, 27, 981–997.
- [79] Yang N.; Lejon T.; Rekdal Ø., Antitumour activity and specificity as a function of substitutions in the lipophilic sector of helical lactoferrin-derived peptide, *J. Pept. Sci.*, 2003, 9, 300–311.
- [80] Okada M.; Ortiz E.; Corzo G.; Possani L.D., Pore-forming spider venom peptides show cytotoxicity to hyperpolarized cancer cells expressing K⁺ channels: A lentiviral vector approach, *PLoS ONE*, 2019, 14, e0215391.
- [81] Shi D.; Hou X.; Wang L.; Gao Y.; Wu D.; Xi X.; Zhou M.; Kwok H.F.; Duan J.; Chen T.; i wsp., Two Novel Dermaseptin-Like Antimicrobial Peptides with Anticancer Activities from the Skin Secretion of *Pachymedusa dactyloides*, *Toxins*, 2016, 8, 144.
- [82] Wang Y.; Cheetham A.G.; Angacian G.; Su H.; Xie L.; Cui H., Peptide–drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, 110–111, 112–126.

-
- [83] Agarwal S.; Mohamed M.S.; Mizuki T.; Maekawa T.; Kumar D.S., Chlorotoxin modified morusin-PLGA nanoparticles for targeted glioblastoma therapy, *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 5896–5919.
- [84] Jin H.; Zhao G.; Hu J.; Ren Q.; Yang K.; Wan C.; Huang A.; Li P.; Feng J.P.; Chen J. i wsp., Melittin-Containing Hybrid. Peptide Hydrogels for Enhanced Photothermal Therapy of Glioblastoma, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9, 25755–25766.
- [85] Opačak-Bernardi T.; Ryu J.S.; Raucher D., Effects of cell penetrating Notch inhibitory peptide conjugated to elastin-like polypeptide on glioblastoma cells, *J. Drug Target.*, 2017, 25, 523–531.
- [86] Seleci D.A.; Seleci M.; Stahl F.; Scheper T., Tumor homing and penetrating peptide-conjugated niosomes as multi-drug carriers for tumor-targeted drug delivery, *RSC Adv.*, 2017, 7, 33378–33384.
- [87] da Silva A.M.; Silva-Gonçalves L.C.; Oliveira F.A.; Arcisio-Miranda M., Pro-necrotic Activity of Cationic Mastoparan Peptides in Human Glioblastoma Multiforme Cells Via Membranolytic Action, *Mol. Neurobiol.*, 2018, 55, 5490–5504.
- [88] Su B.C.; Wu T.H.; Hsu C.H.; Chen J.Y., Distribution of positively charged amino acid residues in antimicrobial peptide epinecidin-1 is crucial for in vitro glioblastoma cytotoxicity and its underlying mechanisms, *Chem. Biol. Interact.*, 2020, 315, 108904.
- [89] Long Q.; Li L.; Wang H.; Li M.; Wang L.; Zhou M.; Su Q.; Chen T.; Wu Y., Novel peptide dermaseptin-PS1 exhibits anticancer activity via induction of intrinsic apoptosis signalling, *J. Cell Mol. Med.*, 2019, 23, 1300–1312.
- [90] Moulahoum H.; Zamani F.G.; Timur S.; Zihnioglu F., Metal Binding Antimicrobial Peptides in Nanoparticle Bio-functionalization: New Heights in Drug Delivery and Therapy, *Proteomics Antimicrob. Proteins*, 2020, 12, 48–63.
- [91] Magri A.; Grasso G.; Corti F.; Finetti F.; Greco V.; Santoro A.M.; Sciuto S.; La Mendola D.; Morbidelli L.; Rizzarelli E., Peptides derived from the histidine-proline rich glycoprotein bind copper ions and exhibit anti-angiogenic properties, *Dalton Trans.*, 2018, 47, 9492–9503.
- [92] McDonald M.; Mannion M.; Pike D.; Lewis K.; Flynn A.; Brannan A.M.; Browne M.J.; Jackman D.; Madera L.; Coombs M.R.; i wsp., Structure–function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomemb*, 2015, 1848, 1451–1461.
- [93] Narayana J.L.; Huang H.N.; Wu C.J.; Chen J.Y., Efficacy of the antimicrobial peptide TP4 against *Helicobacter pylori* infection: In vitro membrane perturbation via micellization and in vivo suppression of host immune responses in a mouse model, *Oncotarget*, 2015, 6, 12936–12954.
- [94] Ting C.H.; Chen J.Y., Nile Tilapia Derived TP4 Shows Broad Cytotoxicity Toward to Non-Small-Cell Lung Cancer Cells, *Mar. Drugs*, 2018, 16, 506.
- [95] Su B.C.; Pan C.Y.; Chen J.Y., Antimicrobial Peptide TP4 Induces ROS-Mediated Necrosis by Triggering Mitochondrial Dysfunction in Wild-Type and Mutant p53 Glioblastoma Cells, *Cancers*, 2019, 11, 171.
- [96] Tian W.; Li B.; Zhang X.; Dang W.; Wang X.; Tang H.; Wang L.; Cao H.; Chen T., Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39, *Oncol. Rep.*, 2012, 28, 1362–1368.
- [97] Mishra A.K.; Choi J.; Moon E.; Baek K.H., Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides, *Molecules*, 2018, 23, 815.
- [98] Stalmans S.; Wynendaele E.; Bracke N.; Knappe D.; Hoffmann R.; Peremans K.; Polis I.; Burvenich C.; De Spiegeleer B., Blood-brain barrier transport of short proline-rich antimicrobial peptides, *Protein Pept. Lett.*, 2014, 21, 399–406.
- [99] Lalatsa A.; Schatzlein A.G.; Uchegbu I.F., Strategies To Deliver Peptide Drugs to the Brain, *Mol. Pharm.*, 2014, 11, 1081–1093.
- [100] Sang Hoon Joo, Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools, *Biomol Ther.*, 2012, 20, 1, 19-26.
- [101] Valko M.; Leibfritz D.; Moncol J. i wsp., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, tom 39, 1, 44-84.
- [102] Valko M.; Rhodes C.J.; Moncol J.; i wsp., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 2006, tom 160, 1, 1-40.
- [103] Reuter S.; Gupta S.C.; Chaturvedi M. M.; i wsp., Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked?, *Free Radical Biology And Medicine*, 2010, tom 49, 11, 1603-1616.

-
- [104] Lopez-Otin C.; Blasco M.A.; Partridge L.; i wsp., The Hallmarks of Aging, *Cell*, 2013, tom 153, 6, 1194-1217.
- [105] Liguori I.; Russo G.; Curcio F.; i wsp., Oxidative stress, aging, and diseases, *Clinical Interventions In Aging*, 2018, tom 13, 757-772.
- [106] L. Zuo, T. Zhou, B.K. Pannell, A.C. Ziegler, T.M. Best, Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly, *Acta Physiol.*, 2015, 214, 329.
- [107] D. A. Patten, M. Germain, M.A. Kelly, R.S. Slack, Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration, *J. Alzheimer's Dis.*, 2010, 20, S357.
- [108] Dai J.; Mumper R.J., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 2010, tom 15, 10, 7313-7352.
- [109] Baur J.A.; Sinclair D.A., Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, tom 5, 6, 493-506.
- [110] P. Di Martino, R. Censi, M. R. Gigliobianco, L. Zerrillo, F. Magnoni, D. Agas, W. Quaglia, G. Lupidi, Nano-medicine Improving the Bioavailability of Small Molecules for the Prevention of Neurodegenerative Diseases, *Curr. Pharm. Des.*, 2017, 23, 13, 1897.
- [111] Ch. Martinelli, C. Pucci, M. Battaglini, A. Marino, G. Ciofani, Antioxidants and Nanotechnology: Promises and Limits of Potentially Disruptive Approaches in the Treatment of Central Nervous System Diseases, *Adv. Healthcare Mater.*, 2020, 9, 3, 1901589.
- [112] G. Mencia, N. Sanz del Olmo, L. Muñoz-Moreno, M. Maroto-Diaz, R. Gomez, P. Ortega, M.J. Carmena, F.J. de la Mata, Antioxidant and Antibacterial Properties of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Polyphenolic Moieties, *New J. Chem.*, 2016, 40, 10488-10497.
- [113] K. Rajavelu, M. Subaraja, P. Rajakumar, Synthesis, optical properties, and antioxidant and anticancer activity of benzoheterazole dendrimers with triazole bridging unit, *New J. Chem.*, 2018, 42, 3282-3292.
- [114] M. Sowinska, M. Morawiak, M. Bochyńska-Czyż, A. W. Lipkowski, E. Ziemińska, B. Zabłocka, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Molecular Antioxidant Properties and In Vitro Cell Toxicity of the p-Aminobenzoic Acid (PABA) Functionalized Peptide Dendrimers *Biomolecules*, 2019, 9, 89.
- [115] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305, 761-770.
- [116] M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1703, 93-109.
- [117] <https://repozytorium.umk.pl/bitstream/handle/item/3056/Wolne-rodniki-RUMAK.pdf?sequence=1>, dostęp 12.02.22,
- [118] Klajnert B.; Cortijo-Arellano M.; Cladera J.; i wsp., Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, tom 345, 1, 21-28.
- [119] Klajnert, B; Cortijo-Arellano, M; Bryszewska, M; i wsp., Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, tom 339, 2, 577-582.
- [120] Wasiak T.; Ionov M.; Nieznanski K.; i wsp., Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer's (A beta(1-28)) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation, *Molecular Pharmaceutics*, 2012, tom 9, 3, 458-469.
- [121] Klementieva O.; Benseny-Cases N.; Gella A.; i wsp., Dense Shell Glycodendrimers as Potential Nontoxic Anti-amyloidogenic Agents in Alzheimer's Disease. Amyloid-Dendrimer Aggregates Morphology and Cell Toxicity, *Biomacromolecules*, 2011, tom 12, 11, 3903-3909.
- [122] Morawiak M., Stolarska M., Cieslak M., Urbanczyk-Lipkowska Z., Interactions of rationally designed acid with α -helix and β -sheet structures of poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid, *Peptide Science*, 2020, tom 112, 3, e24155.
- [123] E.A. Shalaby, S.M.M. Shanab, Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 7, 528-539.
- [124] Gawlik-Dziki U., Świeca M., Dziki D., Sęczyk Ł., Złotek U., Różyło R., Kaszuba K., Ryszawy D., Czyż J., Anticancer and antioxidant activity of bread enriched with broccoli sprouts, *Biomed. Res. Int.*, 2014, tom 2014, 608053.
- [125] M. Cieślak, D. Ryszawy, M. Pudełek, M. Urbanowicz, M. Morawiak, O. Staszewska-Krajewska, J. Czyż, Z. Urbańczyk-Lipkowska, Bioinspired Bola-Type Peptide Dendrimers Inhibit Proliferation and

Invasiveness of Glioblastoma Cells in a Manner Dependent on Their Structure and Amphipathic Properties, *Pharmaceutics*, 2020, 12, 1106.

[126] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46, W315.

[127] D. Pawlak, M. Schielmann, M. Wojciechowski, R. Andruszkiewicz, Synthesis and biological activity of novel ester derivatives of N(3)-(4-metoxifumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid containing amide and keto function as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, 1, 26, 15, 3586-9.