

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické technologie**



**Vliv generace polyamidoaminodendrimerů  
s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii  
na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu**

Diplomová práce

Denisa Houšková

Hradec Králové 2020

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

# Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 12. 5. 2020

Denisa Houšková

# Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Anně Nováčkové za jejich věcné připomínky, poznámky a odborné vedení při psaní této práce.

Dále bych chtěla poděkovat rodině za jejich podporu, především své sestře za pomoc při formálním zpracování a za to že mi při dokončování této práce byla oporou.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 184217, SVV 260547) a Grantové agentuře České republiky (19-09600S).

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

Autor: Denisa Houšková

Název diplomové práce: Vliv generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu.

Dendrimery lze definovat jako vysoce rozvětvené makromolekuly ve tvaru hvězdy s rozměry v řádu nanometrů a neomezenými možnostmi aplikace v biologických i materiálových vědách.

Polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery byly použity jako efektivní enhancery (trans)dermální permeace několika aktivních látek. Inspirována strukturou dendrimerů PAMAM byla navržena nová třída dendrimerů s aminoskupinami na periférii a ethylenediaminovým jádrem. Opakující se motiv bis(2-aminoethyl)glycinu byl využit pro generační růst až do třetí generace. Nové dendritické molekuly nulté, první, druhé a třetí generace byly testovány na jejich schopnost zlepšit ukládání 5-fluorouracilu v různých vrstvách lidské kůže pomocí *ex vivo* permeačních experimentů s Franzovými difúzními celami.

Výsledky naznačují, že dendrimery v koncentraci 20 mg/ml v 60% propylenglykolu ve vodě jako vehikulu jsou schopny doručit 5-fluorouracil do různých vrstev kůže a do akceptorové fáze Franzových cel, a to generačně závislým způsobem bez jakékoli selektivity.

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Consultant: Mgr. Anna Nováčková

Author: Denisa Houšková

Title of thesis: Effect of the generation of amino-decorated polyamidoamine dendrimers with ethylenediamine core at the (trans)dermal delivery of 5-fluorouracil.

Dendrimers can be defined like highly branched, star-shaped macromolecules with nanometer-scale dimensions and unlimited applications in both biological and materials sciences.

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers have been used to effectively enhance the (trans)dermal drug delivery of several active substances. Inspired by the structure of PAMAM dendrimers, a new class of dendrimers was designed having amino-functionalized periphery and ethylenediamine core. A repeating motif of bis(2-aminoethyl)glycine was used for generation growth up to the third generation. The new dendritic molecules of zero, first, second and third generation were tested for their ability to enhance the deposition of 5-fluorouracil in the different layers of human skin *ex vivo* by using Franz diffusion cells.

The results suggest that the new dendrimers, at a concentration of 20 mg/mL in 60 % propylene glycol in water as vehicle, are able to deliver 5-fluorouracil at the different skin layers and at the acceptor phase of the Franz cells in a generation depended manner without any selectivity.

# Obsah

Úvod a cíl práce .....	8
<b>Teoretická část.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Lidská kůže.....</b>	<b>10</b>
1.1 Stavba kůže a její funkce.....	10
1.2 Stratum corneum .....	13
1.3 (Trans)dermální podání látek .....	15
<b>2. Formy transdermální aplikace léčiv .....</b>	<b>17</b>
2.1 Polotuhé a kapalné léčivé přípravky pro transdermální aplikaci .....	18
2.2 Transdermální náplasti .....	18
2.2.1 Periferně adhezivní matricové přípravky .....	18
2.2.2 Přípravky s kapalným rezervoárem a modulační membránou....	19
2.2.3 Elastické laminované přípravky .....	19
<b>3. Akceleranty (trans)dermální permeace .....</b>	<b>20</b>
3.1 Mechanismus účinku akceleraantů .....	20
3.2 Příklady látek používaných jako akceleranty .....	20
3.2.1 Dimethylsulfoxid (DMSO) .....	21
3.2.2 Dodecylester kyseliny <i>N,N</i> -dimethyl-6-aminohexanové (DDAK)	
21	
<b>4. Dendrimery.....</b>	<b>22</b>
4.1 Základní informace a historie.....	22
4.2 Syntéza dendrimerů.....	23
4.2.1 Konvergentní syntéza dendrimerů .....	24
4.2.2 Divergentní syntéza dendrimerů .....	25
4.3 Použití dendrimerů ke kožní aplikaci.....	27
<b>Experimentální část .....</b>	<b>29</b>

<b>5. Použité přístroje, chemikálie a programy .....</b>	<b>29</b>
<b>6. Syntéza .....</b>	<b>30</b>
6.1 Syntéza N,N''-Bis( <i>terc</i> -butyloxycarbonyl)diethylenetriaminu .....	30
6.2 Syntéza N,N''-Bis( <i>terc</i> -butyloxycarbonyl)diethylentriaminyl-N'- [glycinbenzyl ester] .....	30
6.3 Syntéza N,N''-Bis( <i>terc</i> -butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyl-N'- glycinu	31
6.4 Syntéza 1,2-Bis(bromoacetylamino)ethanu .....	32
6.5 Syntéza N,N'-Bis[(bis{2-[( <i>terc</i> -butoxycarbonyl)amino]ethyl} amino) acetyl]-1,2-diaminoethane, G0-Boc .....	32
6.6 Syntéza chlorovodíkové soli nulté generace, G0-HCl .....	33
6.7 Syntéza Boc chráněné první generace dendrimery, G1-Boc .....	34
6.8 Syntéza chlorovodíkové soli první generace, G1-HCl.....	35
6.9 Syntéza Boc chráněné druhé generace dendrimery, G2-Boc.....	36
6.10 Syntéza chlorovodíkové soli druhé generace, G2-HCl .....	37
6.11 Syntéza Boc chráněné třetí generace dendrimery, G3-Boc.....	38
6.12 Syntéza chlorovodíkové soli třetí generace, G3-HCl.....	39
<b>7. Permeace.....</b>	<b>41</b>
7.1 <i>Ex vivo</i> permeační pokusy.....	41
<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>43</b>
<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>52</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>54</b>

# Úvod a cíl práce

Nejsvrchnější vrstva kůže, *stratum corneum*, je ochrannou bariérou pro lidské tělo. Tato bariérová funkce musí být překonána, pokud má být účinná látka doručena do kůže nebo přes kůži. Mnoho molekul bylo testováno na jejich schopnost zvyšovat depozici nebo pronikání účinných látek touto cestou. Ideální enhancer (trans)dermální permeace by měl být schopen reverzibilně narušit funkci kožní bariéry. PAMAM dendrimery byly testovány a potvrzeny jako úspěšné enhancery kožní permeace. Díky jejich jedinečné a větvící se struktuře mají speciální vlastnosti, které jsou pro tuto funkci prospěšné.

Hlavním cílem této práce bylo navrhnout, syntetizovat a plně charakterizovat nižší generace nových dendritických molekul s podobnými strukturálními charakteristikami jako dendrimery PAMAM a vyhodnotit jejich účinnost jako enhancerů (trans)dermální permeace. Konkrétně byl zkoumán účinek generace dendrimerů na doručení 5-fluorouracilu do různých vrstev kůže.



# Teoretická část

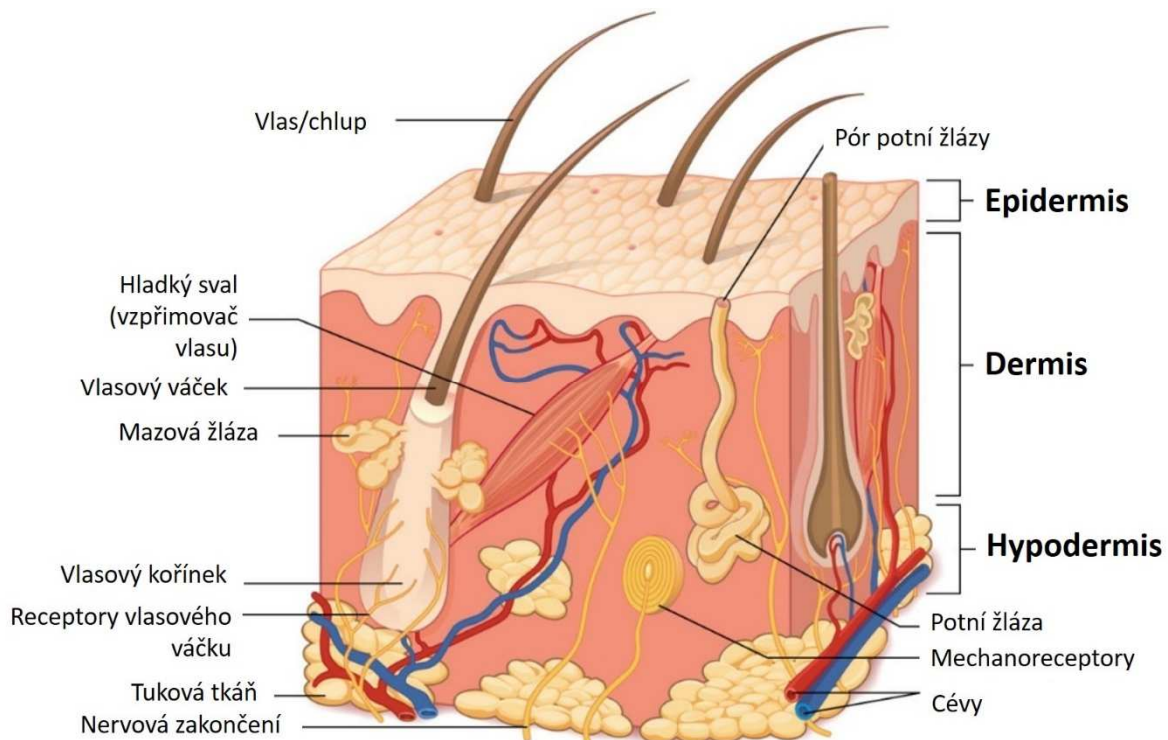
Teoretická část této diplomové práce se zabývá lidskou kůží, její strukturou a funkcí. Detailněji se zaměřuje na nejsvrchnější vrstvu epidermis zvanou *stratum corneum* a dále popisuje (trans)dermální podání léčiv, základní rysy léčiv, která jsou vhodná pro (trans)dermální podání, jaké jsou formy této aplikace léčiv a čím je možno tento proces ovlivnit (enhancery). V další části jsou popsány dendritické molekuly, jejich vlastnosti, syntéza a použití.

# 1. Lidská kůže

Jedná se o největší orgán lidského těla, který může zaujímat až 15 % celkové váhy člověka. [1] Například průměrný člověk vážící kolem 70 kg bude mít váhu kůže více než 5 kg a její povrch bude přibližně 2 m<sup>2</sup>. [2] Lidská kůže má mnoho různých funkcí. Jednou z nich je ochrana těla před mechanickými, fyzikálními, biologickými a chemickými vlivy. [3] Mezi fyzikální vlivy patří například teplota či vlhkost, mezi biologické pak viry a bakterie a mezi chemické například cizorodé sloučeniny. Kromě ochranné funkce plní kůže také funkci senzoryckou (např. vnímání bolesti) [4] a funkci termoregulační. Kůže se účastní i dýchání. [3]

## 1.1 Stavba kůže a její funkce

Lidská kůže se skládá ze 3 vrstev (viz obrázek č. 1). Nejspodnější vrstva se nazývá *hypodermis* (též například *subcutis*, *subdermis*, podkoží nebo podkožní tkáň), následuje *dermis* (škára) a nejsvrchnější část se jmenuje *epidermis* (pokožka). [3]



Obrázek č. 1 – 3 vrstvy lidské kůže (*epidermis*, *dermis*, *hypodermis*) [5]

Nejspodnější vrstvou kůže je tedy *hypodermis* (podkožní vazivo, podkoží). Její funkcí je připojení kůže k vláknité tkáni kostí a svalů. Tvoří ji dobře vaskularizovaná pojivová tkáň a tuková tkáň, která slouží jako zásobárna tuku a poskytuje tělu izolaci. [5]

V *dermis* se vyskytují krevní a lymfatické cévy, nervy a další struktury jako například vlasové folikuly či potní žlázy. *Dermis* je uspořádána do dvou vrstev (*stratum papillare* a *stratum reticulare*), které tvoří síť elastinu a kolagenních vláken [5] (viz obrázek č. 2).

1. ***Stratum papillare*** – papilární vrstva *dermis* je tvořena volnou pojivovou tkání, což znamená, že kolagenová a elastinová vlákna této vrstvy tvoří volnou síť. Tato vrstva zasahuje do *stratum basale* a vytváří tzv. prstovité dermální papily (viz obrázek č. 2). V papilární vrstvě se vyskytují fibroblasty, adipocyty (pouze v malém množství), malé krevní cévy, fagocyty, lymfatické cévy, nervová vlákna a Meissnerova tělíska (dotykové receptory). [5]
2. ***Stratum reticulare*** – pod papilární vrstvou je silnější síťová vrstva, která je tvořena hustou nepravidelnou pojivovou tkání. V této vrstvě se nachází velké množství sensorických a sympatických nervů, je taktéž hojně vaskularizovaná. Elastinová vlákna poskytují pokožce pružnost a umožňují pohyb. Kolagenová vlákna vytváří strukturu a poskytují pevnost v tahu, kolagen také váže vodu a udržuje pokožku hydratovanou. [5]

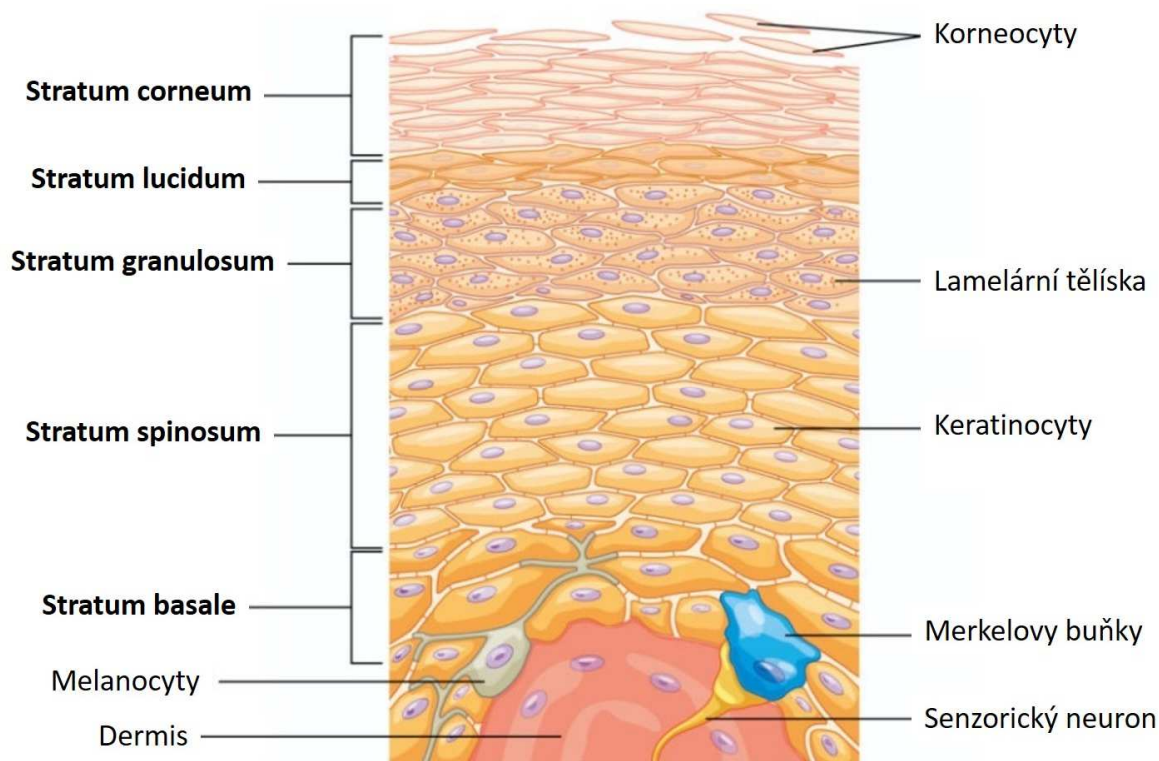


Obrázek č. 2 – *dermis* (*stratum papillare* a *stratum reticulare*) [5]

*Epidermis* je převážně tvořena keratinocyty, které tvoří 95 % buněk této vrstvy. Zbýlých 5 % pak tvoří melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. [1] Její tloušťka se pohybuje mezi 0,05-0,1 mm a je rozdělena na několik vrstev. [2] Konkrétně se jedná o *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (řazeno od

nejspodnější po nejsvrchnější vrstvu, viz obrázek č. 3). Počet vrstev se liší v závislosti na části lidského těla. Ve většině případů se dělí jen na čtyři vrstvy (chybí *stratum lucidum*). [5]

1. ***Stratum basale*** – jedná se o nejspodnější vrstvu *epidermis*, která ji spojuje s bazální laminou, pod kterou se nachází *dermis*. Buňky vyskytující se ve *stratum basale* jsou propojeny s *dermis* pomocí kolagenových vláken označovaných jako bazální membrána. *Stratum basale* je tvořeno jednou vrstvou buněk, primárně se jedná o bazální (neboli kmenové) buňky ve tvaru kvádrů, které jsou prekurzory pro keratinocyty. Kromě bazálních buněk je zde možné najít Merkelovy buňky a melanocyty. Merkelovy buňky fungují jako receptory a jsou zodpovědné za stimulaci sensorických nervů, což mozek vnímá jako dotek. Nejvíce těchto buněk je tedy logicky na povrchu rukou a nohou. Melanocyty produkují kožní pigment melanin, který dává barvu vlasům a nehtům a také napomáhá ochraňovat buňky před škodlivým UV zářením. [5]
2. ***Stratum spinosum*** – tuto vrstvu tvoří několik řad keratinocytů (výsledek buněčného dělení ve *stratum basale*). Keratinocyty produkují keratin a uvolňují vodu-odpuzející glykopeptid, který napomáhá zabránit ztrátě vody z těla. Keratin agreguje ve filamenta a ta tvoří tzv. desmozómy. Mezi keratinocyty se nacházejí Langerhansovy buňky, které fungují jako makrofágy pohlcující bakterie, cizorodé částice a poškozené buňky. [5] Název *stratum spinosum* vznikl z toho, že buňky mají výběžky, které připomínají ostny, a díky nim jsou v kontaktu s výběžky ostatních buněk. [6]
3. ***Stratum granulosum*** – tato vrstva má osobitý zrnitý vzhled, což je způsobeno tím, že keratinocyty jsou tlačeny ze *stratum spinosum*, což u nich způsobí jisté změny. Za zrnitý vzhled je tedy zodpovědná pozměněná struktura keratinocytů, které produkují velké množství keratinu a keratohyalinu. [5]
4. ***Stratum lucidum*** – tuto tenkou vrstvu můžeme najít pouze v *epidermis* dlaní a chodidel. Je tvořena keratinocyty, které jsou zploštělé a odumřelé, a jsou obaleny proteinem bohatým na lipidy. Díky tomu mají buňky typický (lucidní) vzhled a poskytují bariéru vůči vodě. [5]
5. ***Stratum corneum*** – Kvůli důležitosti této vrstvy je jí vyhrazena samostatná podkapitola (viz podkapitola 1.2. *Stratum corneum*). [5]

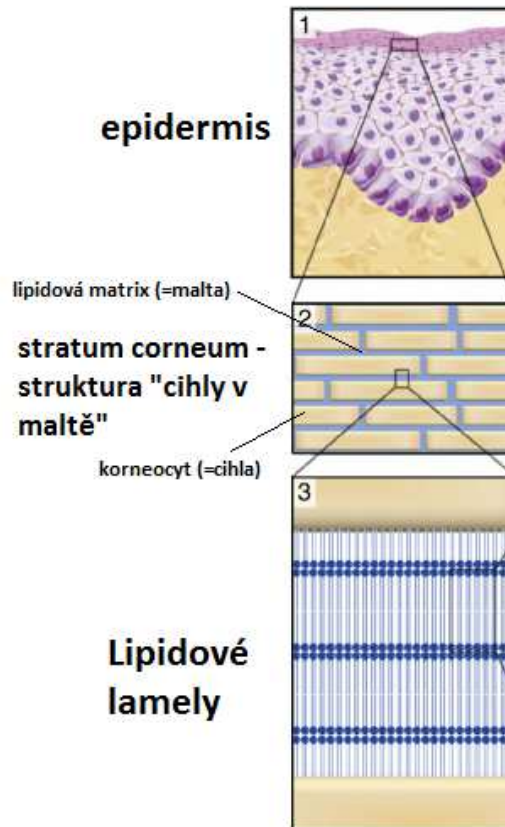


Obrázek č. 3 – Znáznornění vrstev epidermis [5]

## 1.2 Stratum corneum

*Stratum corneum* (SC) je nejsvrchnější vrstva *epidermis*, která je vystavena vnějšímu prostředí [5] (viz obrázek č. 4), primárně tedy poskytuje ochranu kůže. Nachází se zde několik desítek vrstev buněk (10-25). [7] Tyto buňky zabraňují pronikání mikrobu, dehydrataci spodnějších vrstev kůže a taktéž poskytují mechanickou ochranu proti oděru. Jsou řazeny pravidelně a periodicky nahrazovány buňkami, které jsou vytlačovány ze spodnější vrstvy. Celá vrstva se vymění přibližně za dobu 4 týdnů. [5] Buňky ve SC se nazývají korneocyty, jedná se o buňky, které ztratily jádro a cytoplazmatické organely. V jejich membráně se nachází nerozpustná zrohovatělá vrstva tvořená vysoce zesítěnými nerozpustnými proteiny, vnitřek korneocytů tvoří voda a mikrofibrilární keratin. [1] Na proteinovou vrstvu je kovalentně vázána monovrstva ceramidů, podle které jsou orientovány další vrstvy lipidů. [8] Korneocyty jsou tedy vysoce nerozpustné a rezistentní k působení chemikálií. [9] Prostor mezi korneocyty je vyplněn lipidovou matrix (tu tvoří především mastné kyseliny, steroly, ceramidy – viz dále). [8] Lipidy tvoří lamely, které jsou složeny z několika dvojvrstev. Dvojvrstvy lipidů směřují svou hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní vně do vodného prostředí. [9] Struktura SC je občas označena jako struktura „cihel v maltě“ (viz obrázek č. 4), kde cihly představují korneocyty a

malta lipidovou matrix. [8] SC můžeme rozdělit na tři různé části - biochemickou a funkční část (vnější absorbér solutů), prostřední absorbér vody pro hydrataci a vnitřní mechanickou obrannou bariéru. [2]



Obrázek č. 4 – stratum corneum [7]

Složení a strukturální uspořádání mezibuněčných lipidů je pravděpodobně nejdůležitější pro bariérovou funkci této vrstvy, jelikož složení určuje fyzikálně-chemické vlastnosti SC. [9] Pokud látky chtějí kůži prostoupit, musí tuto lipidovou matrix překonat, ať už přestupují transcelulárně nebo paracelulárně, jelikož je téměř rovnoměrně rozložena v celém SC.

Hlavní polární lipidy ve SC se nazývají ceramidy (15 typů), molekula ceramidu obsahuje obecně polární hlavu a dva hydrofobní řetězce. Díky menší polární hlavě (oproti fosfolipidům, které v lamelách přítomny nejsou) je umožněno těsně uspořádání v lamele. Ceramidy mají také delší hydrofobní řetězce a tvoří několikavrstvé vzájemně propojené lamelární struktury. Tvoří nejdůležitější a nejspecifičtější část lipidů ve SC (lamely jsou jimi tvořeny cca z 50 %). Další podstatnou část tvoří mastné kyseliny (10 %), konkrétně se jedná především o kyselinu behenovou (C<sub>22</sub>) a lignocerovou (C<sub>24</sub>), dále se vyskytují kyselina stearová,

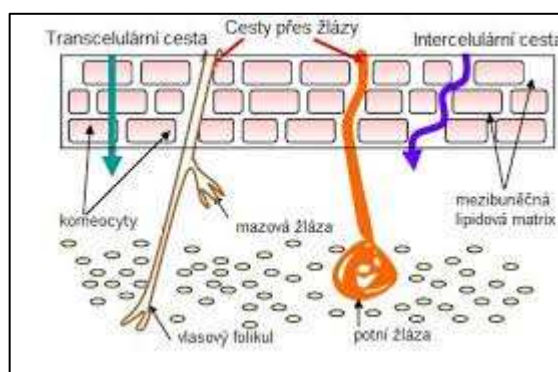


palmitová apod. Třetí nejvíce zastoupenou složkou je cholesterol (25 %), který zde funguje jako stabilizátor lipidických struktur. [8]

### 1.3 (Trans)dermální podání látek

I když bariérové vlastnosti SC poskytují tělu ochranu, existují cesty, jak se látka může do kůže, popřípadě skrz kůži až do krevního oběhu, dostat. Pokud látka prostupuje do nějaké vrstvy kůže a působí v kůži, jedná se o dermální podání (=penetrace). Prostup látky kůží až do krevního oběhu se nazývá transdermální podání (=permeace). [10]

Existuje několik cest, kterými se látka může do kůže (popřípadě skrz kůži) dostat. Jde především o průnik skrz potní žlázy a mazové žlázy, transfolikulárně (čili pomocí vlasového folikulu), intercelulárně a transcelulárně (obrázek č.5). Průnik potní žlázou je možný pouze pro látky vysoce hydrofilní. Prostup přes mazové žlázy a transfolikulární zahrnuje látky lipofilní, avšak dohází k jejich kumulaci, a tudíž nejsou schopny pronikat dále. [9]



Obrázek č. 5 – (trans)dermální prostup látek [11]

Nejpravděpodobnější prostup látek do kůže je buď cestou transcelulární nebo intercelulární. [9] Transcelulární cestou je myšlen prostup látky přes korneocyty, intercelulární cesta znamená prostup přes lipidové lamely. Prostup látek přes korneocyty je však složitý, aby byl prostup usnadněn, je nutno zvýšit obsah vody ve SC. To je umožněno díky tomu, že korneocyty obsahují aminokyseliny schopné vázat vodu. Korneocyty tak bobtnají a dochází ke změně viskozity lipidové matrix a ke částečnému narušení integrity lipidových lamel. [9] Proto největší podíl léčiv prostupuje cestou intercelulární. [3]

Aby léčivo procházelo kůží, mělo by splňovat určitá kritéria. První z těchto kritérií je, že by mělo mít nízkou molekulární hmotnost, pokud možno méně než 600 Da, zatímco difuzní koeficient by měl být vysoký. Dále je podstatné, aby léčivo bylo dostatečně rozpustné ve vodě

i oleji (rozdělovací koeficient kolem jedné). [12] Pokud je jeho hodnota příliš vysoká, mohla by být snížena clearance v živých tkáních. Vzhledem k faktu, že kůže má schopnost dané léčivo metabolizovat svými enzymy, je někdy žádoucí přísada inhibitorů enzymů při aplikaci molekul léčiva. [3]

Ve většině případů nejsou molekuly schopné prostoupit do nebo skrz kožní bariéru, a proto byly vyvinuty akceleranty (trans)dermální permeace (viz kapitola č. 3).



## 2. Formy transdermální aplikace léčiv

Pro dosažení požadovaného účinku léčiva jsou důležité nejen jeho chemické vlastnosti, ale i cesta podání do organismu neboli léková forma léčiva. Mezi nejpopulárnější lékové formy patří perorální lékové formy, parenterální lékové formy a rektální lékové formy, avšak každá z těchto forem s sebou nese určité nevýhody. U perorálních lékových forem můžeme zmínit například malou biologickou dostupnost některých léčiv z GITu, interakce s potravou a s tou související proměnlivost absorpce apod. Nejvýznamnější nevýhoda je pravděpodobně „first pass“ efekt v játrech. Co se týče parenterální aplikace léčiv, mezi nevýhody patří, že k aplikaci je většinou potřeba zdravotnický personál. U rektálních přípravků se můžeme setkat s potížemi, které byly vyvolány lokální dráždivostí. Vzhledem k těmto nevýhodám se výzkum zaměřil i na jiné lékové formy, a to sice transdermální lékové formy. [13]

Mezi výhody transdermálních přípravků patří to, že jsou snadno aplikovatelné, absorpce není primárně ovlivněna režimem pacienta, obchází „first pass“ metabolismus [14], je sníženo riziko předávkování a aplikaci léčiva lze rychle přerušit. [13] Bezpochyby velikým pozitivem oproti injekčním přípravkům je bezbolestná aplikace a fakt, že nevytváří riziko přenosu nemocí opakovaným použitím. Ačkoliv je transdermální podání léčiv velice podstatnou součástí lékařské praxe, ještě stále bohužel nedosáhlo takového využití jako perorálně užívané lékové formy a podkožní injekce. [14]

Co se týče nevýhod, můžeme se setkat s podrážděním kůže (tření, tlak) a také s lokálními, případně systémovými nebo alergickými reakcemi. [13] Mezi nevýhody lze jistě zařadit i skutečnost, že počet léků, které lze aplikovat touto cestou, je omezený. [14]

Transdermální podávání léčiv lze v podstatě rozdělit do tří generací. První generaci tvoří přípravky, které přes kůži dodávají malá, lipofilní léčiva v malé dávce, v dnešní době se jedná o největší počet transdermálních náplastí. Transdermální systémy druhé generace využívají ke zlepšení průniku akceleranty, popřípadě se sem řadí přípravky využívající ultrazvuk. Bylo zjištěno, že u aplikace protizánětlivých látek pomocí ultrazvukových sond se zvýšila účinnost, a to především díky narušení vrstvy SC. Dále se do této generace řadí iontoforéza [14] (dodání léčiva je řízeno elektrickým nábojem, příkladem může být fentanylový analgetický systém). [15] Jedná se však o systémy, které mají malé klinické využití pro makromolekuly. Třetí generace cílí na bariérové vlastnosti SC (zatímco hlubší tkáň nejsou poškozeny) pomocí mikrojehel, tepelné ablace, mikrodermabraze, elektroporace a kavitačního ultrazvuku. Pomocí této generace lze dodávat přes kůži i makromolekuly, včetně terapeutických proteinů a

vakcín. [14] Existují již i transdermální systémy, které neslouží k dodávání léčiva, ale k extrakci analytů z kůže (například monitorování hladiny glukózy). [16] V této práci je uvedeno jednodušší rozdělení transdermálních přípravků ve dvou následujících podkapitolách.

## **2.1 Polotuhé a kapalné léčivé přípravky pro transdermální aplikaci**

Mezi polotuhé léčivé přípravky pro transdermální aplikaci řadíme masti, krémy a gely. [13] Další variantou je například odměřený kapalný sprej. [14] Nanášejí se roztíráním na kůži a dávka je definována dávkovacím systémem lékové formy (např. speciální pumpičky, jednodávkové gely atd.). [17, 18]

## **2.2 Transdermální náplasti**

Jedná se o léčivé přípravky, jejichž aplikace spočívá v přilepení na zdravou kůži. Léčivo se z náplasti uvolňuje konstantní rychlostí a náplast má být konstruována tak, aby uvolňování nezáleželo na variabilitě kůže, ale na vlastnostech daného přípravku. Aby bylo možné zmíněné lineární uvolňování léčiva, je nutné, aby byla v náplasti obsažena dostatečná koncentrace léčiva v tzv. matrici (zásobníku). Z náplasti se uvolní při aplikaci přibližně 10-20 % léčiva, které je v ní obsaženo, což je sice relativně malá část, avšak pro kinetiku nultého řádu (popřípadě k této kinetice se blíží) jiná možnost není. [3] Vůbec první transdermální přípravek byla třídní transdermální náplast se skopolaminem, která byla schválena v roce 1979 v USA. Odhaduje se, že v dnešní době se ročně vyrobí více než miliarda transdermálních náplastí. [14]

Členění transdermálních přípravků existuje celá řada a každý autor je dělí jinak. Lze uvést například rozdělení na 5 typů dle Chalabaly [3]: náplast se samolepící matricí, náplast, kde je uvolňování léčiva řízeno membránou, náplast, kde je uvolňování léčiva řízeno lepkovou vrstvou, dále pak náplast, kde je léčivo dispergováno v polymerové matrici, která je inertní, a posledním pátým typem je matricová náplast, kde jsou upravené mikročástice léčiva. Pro zjednodušení a přehlednost je uvedeno rozdělení na 3 základní druhy náplastí.

### **2.2.1 Periferně adhezivní matricové přípravky**

Tyto přípravky (obrázek č. 6A) obsahují hydrofilní či lipofilní polymerní matrici ve tvaru disku (kotouče), který má definovanou tloušťku i plochu. V matrici je dispergováno léčivo (= roztok či suspenze léčiva na obrázku 6A). Tato kotoučová matrice s dispergovaným léčivem je umístěná na nepropustné, okluzivní nosné membráně. Na svrchní nosné membráně je nanosená adhezivní vrstva, kterou je realizována fixace. Jako adhezivum jsou většinou

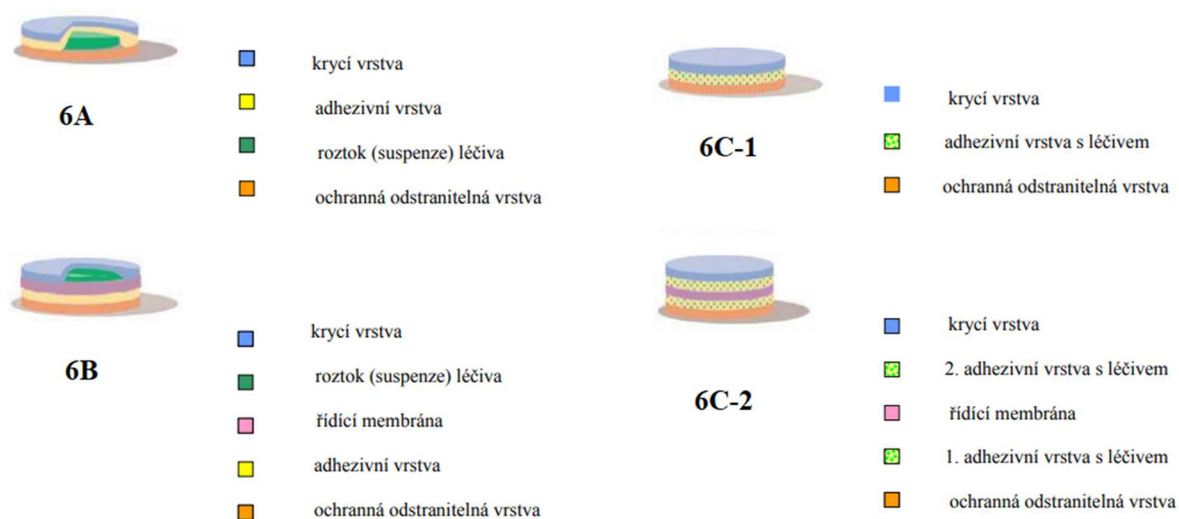
použity akryláty či silikonová lepidla. [3] Tato vrstva kotví matrici a zároveň adhezuje k pokožce. Jejich hlavní nevýhodou se jeví to, že matricové přípravky nedovolují liberaci kinetikou nultého řádu. [13]

## 2.2.2 Přípravky s kapalným rezervoárem a modulační membránou

Jedná se o přípravky, kde se nachází kapalný rezervoárový kompartment (=roztok či suspenze léčiva na obrázku 6B), který je uzavřen nosnou folií a neporózní (popřípadě mikroporózní) řídicí membránou, která slouží k liberaci léčiva. Adhezivní vrstva je nepropustná pro léčivo. K pokožce adhezuje tento přípravek pomocí hypoalergenního polymeru, který by neměl mít žádný větší vliv na uvolňování léčiva. [13]

## 2.2.3 Elastické laminované přípravky

Elastické laminované přípravky vznikly z matricových přípravků z důvodu zmenšení plochy přípravků a kvůli zajištění kinetiky nultého řádu. Těchto cílů bylo dosaženo díky užití nejméně dvou ploch, které jsou vrstvené na sebe. Jedna z těchto ploch má řídicí funkci při uvolňování léčiva. Může zároveň i poskytovat adhezi, pokud se jedná o jednodušší případ (obrázek č. 6C-1), ale obvykle jsou tyto přípravky vícevrstevné – rezervoárovým gradientem řízené (pomocí řídicí membrány) (obrázek č. 6C-2). [13]



Obrázek č.6 – Zobrazení transdermálních náplastí [19]

### 3. Akceleranty (trans)dermální permeace

Vzhledem k tomu, že lidská kůže má pozoruhodné vlastnosti, které se tak původně vyvinuly kvůli tomu, aby se voda a elektrolyty udržely uvnitř a chemikálie, mikroby a alergeny vně, musely být vyvinuty různé techniky, které napomáhají látkám tuto skutečnost překonat a které snižují odolnost kůže. [20]

Akceleranty (=enhancery) jsou látkami, které zvyšují permeaci (penetraci) tím, že reverzibilně snižují bariérový odpor SC, aniž by poškodily zdejší buňky. Akceleranty by měly být především látky, které nejsou dráždivé, toxické a alergenní. Dále mezi žádoucí vlastnosti patří to, aby měly reverzibilní (pokud jsou z kůže odstraněny, vlastnosti kožní bariéry by se měly rychle vrátit do původního stavu), předvídatelný, rychlý [20] a reprodukovatelný efekt. Akceleranty nesmějí mít vlastní farmakologický efekt a jejich funkce musí být pouze jednosměrná čili mají napomáhat průniku látek do kůže, nikoliv naopak. [12] V ideálním případě by akceleranty měly být kompatibilní s léčivými, kosmeticky přijatelné [20] a levné. [21]

#### 3.1 Mechanismus účinku akceleraantů

Jedná se o chemicky různorodou skupinu látek, jejich mechanismus účinku tak spočívá v nespécifických interakcích se strukturami kůže. Jsou tři možné mechanismy účinku, které akceleranty pravděpodobně využívají, ať už jednotlivě nebo jejich kombinací [21] (kombinace mechanismů bývá nejčastější). [20] První mechanismus spočívá v rozrušení organizované struktury lipidů v intracelulárních prostorech [12] (zvyšuje se fluidita a méně rigidní struktura se stává propustnější). [21] Za druhé může akceleraant interagovat s intracelulárními proteiny kůže [12] (jedná se hlavně o interakci s  $\alpha$ -keratinem, buňky bobtnají a léčivo jimi lépe prochází). [21] Za třetí může optimalizovat hodnotu rozdělovacího koeficientu. [21]

#### 3.2 Příklady látek používaných jako akceleranty

Mezi zástupce akceleraantů se řadí velké množství molekul, které lze rozdělit podle různých principů. Například dle původu je lze dělit na přírodní, syntetické a polosyntetické. V současné době jsou jako akceleranty zkoumány například i přírodní esenciální oleje (eukalyptový olej, pepermintový olej, bazalkový olej apod.). Vzhledem k tomu, že se jedná o sloučeniny se složitým a proměnlivým složením, je komplikované přesně objasnit mechanismus účinku. Studie ukázaly, že přírodní éterické oleje (eukalyptový olej, hřebíčkový olej, tulsí olej a olej z černého kmínu) zvyšují percutánní absorpci karvedilolu působením na lipidy ve SC a také uvolněním vodíkových vazeb mezi ceramidy. [22]

Další možné členění je dle chemických vlastností, díky čemuž může být většina klasifikována jako rozpouštědla s nízkou molekulární hmotností, dále amfifilní molekuly (včetně povrchově aktivních látek) a peptidy. [20]

V neposlední řadě je možné dělení podle hlavní funkční skupiny. [20] Tento parametr zahrnuje enhancery zejména ze skupin alkoxy-sulfoxidů, alkoholů, diolů a acetalů (spíše se jedná o koakceleranty), mastných kyselin a jejich esterů, derivátů hydroxykyselin, amidů kyselin, aminokyselin, derivátů  $\omega$ -aminokyselin (do této skupiny patří akceleranty v dnešní době nejvíce studované a nejúčinnější), derivátů močoviny, aminů, ketonů, terpenů, derivátů sacharidů. [21] Vůbec první sloučeninou, která byla navržena jako enhancer, byl Azone®, který byl patentovaný v roce 1976. [20] Mnoho silných enhancerů jsou amfifilní molekuly, které se skládají z hydrofilní polární hlavy a lipofilního řetězce. U sloučenin s nasyceným řetězcem se nachází vztah mezi délkou řetězce a účinností. Obvykle tvoří tyto řetězce 10-12 atomů uhlíku. U nenasyčených uhlovodíků tvoří optimum kolem 18-20 uhlíků. [20]

Nakonec je důležité zmínit, že jako enhancery jsou zkoumány i makromolekuly, mezi které patří i dendrimery, které budou popsány v samostatné kapitole. [22]

### **3.2.1 Dimethylsulfoxid (DMSO)**

Jedná se o jeden z prvních akceleračních transdermálních permeací patřících do skupiny alkylsulfoxidů. Tato bezbarvá molekula bez zápachu je hygroskopická a používá se velmi často v mnoha různých farmaceutických odvětvích jako univerzální rozpouštědlo. Ačkoliv se jedná o velmi dobrý akcelerační, jsou s ním spojeny určité problémy. Optimální účinek DMSO jako akceleračního nastává v případě, že kosolvent obsahuje více než 60 % DMSO, taková koncentrace však může způsobit kožní erytém. [12]

### **3.2.2 Dodecylester kyseliny *N,N*-dimethyl-6-aminohexanové (DDAK)**

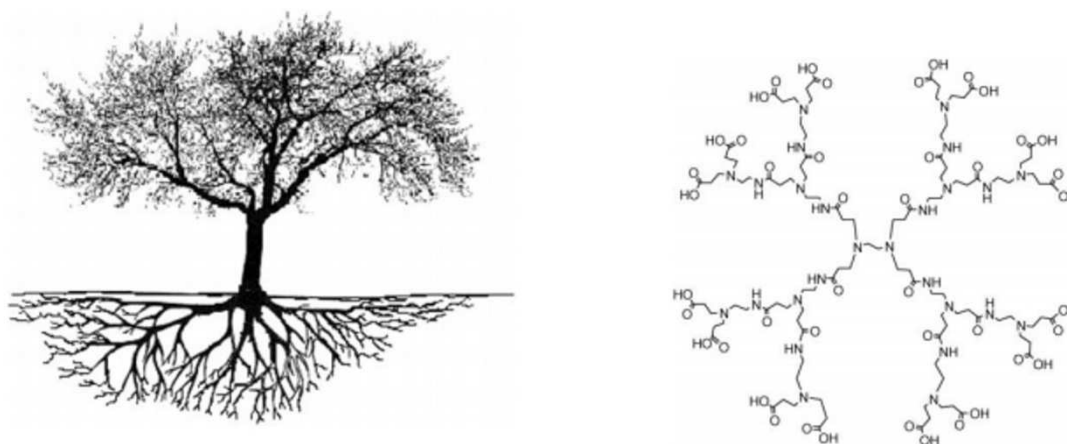
Tento akcelerační vznikl kombinováním již dvou známých akceleračních. Jedná se o kombinaci DDAIP (dodecylester kyseliny 2-(dimethylamino)propanové) a T12 (transkarbam 12). Z akceleračního DDAIP byla vzata ionizovatelná dimethylamino polární hlava a z T12 byl použit spojovací uhlíkový řetězec s 5 atomy uhlíku. Jediným strukturálním rozdílem mezi DDAK a DDAIP je tedy spojovací skupina (u DDAK je nerozvětvená o počtu pěti uhlíků a u DDAIP je rozvětvená). Co se týče porovnání funkčnosti těchto molekul coby akceleračních, byla použita 4 modelová léčiva – theofylin, hydrokortizon, adefovir a indometacin. DDAK vykazoval výrazně lepší výsledky u theofylinu, hydrokortizonu a adefoviru, DDAIP vycházel lépe u indometacinu. [22]

# 4. Dendrimery

## 4.1 Základní informace a historie

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené, multivalentní a monodisperzní polymery. [23] Zájem o tyto molekuly začal narůstat v osmdesátých letech 20. století, ačkoliv myšlenka přípravy rozvětvených molekul byla představená už v roce 1941. [24, 25] První článek, který popsal syntézu nízkomolekulárních dendritických polyaminů, publikoval F. Vögtle v roce 1978. [26] Dále R. G. Denkewalter patentoval syntézu poly(lysin)dendrimerů až do 10. generace odlišnou metodou. [27] V roce 1985 [26] publikoval D. A. Tomalia syntézu poly(amidoamin) (PAMAM) dendrimerů do 10. generace, Tomalia se svým týmem stojí také za vznikem názvu „dendrimery“. V dnešní době patří PAMAM dendrimery k nejvíce charakterizovaným a nejlépe pochopeným skupinám dendrimerů. [23] Dále v tentýž rok vyšla publikace G.R. Newkoma o syntéze poly(ether)dendrimerů až do 3. generace. [28]

Název „dendrimery“ pochází z řečtiny a český překlad zní přesně „část stromu“, jelikož je toto slovo složeno ze dvou řeckých slov, a to sice „*dendro*“ (strom) a „*meros*“ (část). [26] Dendritické motivy jsou patrné jak u koruny stromů, tak u kořenů v podzemí.

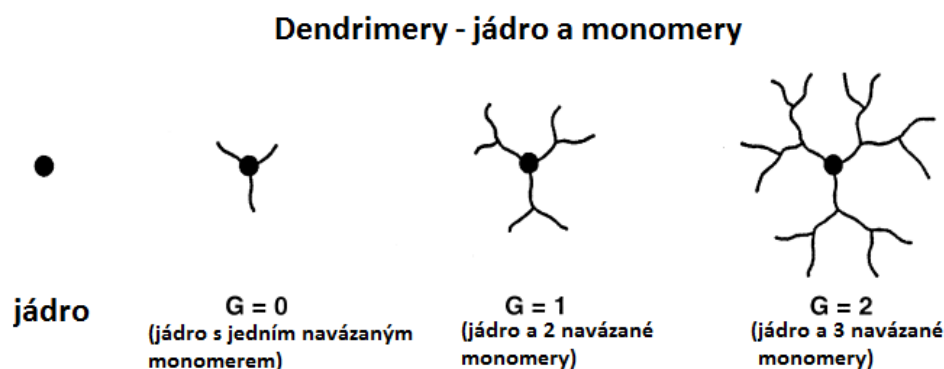


ukázka struktury PAMAM dendrimeru

*Obrázek č.7 – porovnání vzhledu vzrostlého stromu a struktury dendrimeru – můžeme vidět, že koruna i rozvětvené kořeny stromu v podzemí mají strukturu podobnou molekule dendrimerů [29]*

Dendrimery mají unikátní strukturu (jádro a skořápka), kterou tvoří tři základní komponenty. Tyto komponenty jsou jádro, monomer a terminální funkční skupiny. Jádro je

základní stavební jednotka, na kterou navazují monomery (vnitřní částí skořápky), které jsou tvořeny opakujícími se, symetricky se větvcími jednotkami. Terminální funkční skupiny (vnější část skořápky) jsou navázány na monomery. Počet opakovaných vrstev monomerů určuje, o jakou generaci dendrimerů se jedná. Přidáním vrstvy monomeru vzniká vyšší generace dendrimeru – viz obrázek č.8. [29]



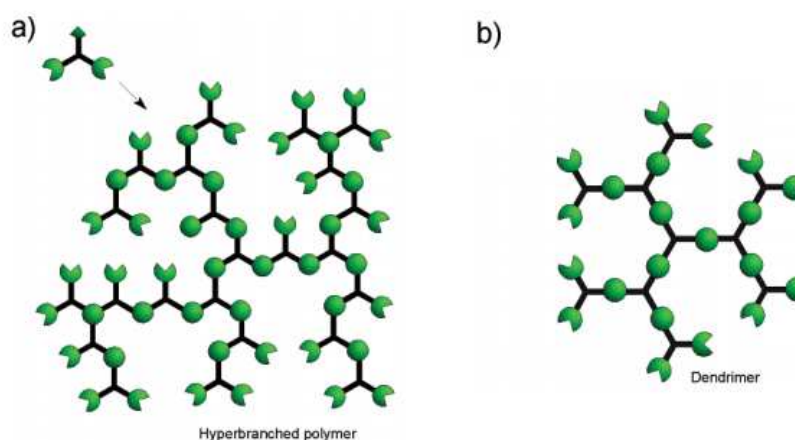
Obrázek č.8 – struktura dendrimerů, jádro a navazující vrstvy monomeru a s tím vznikající vyšší generace (G). [26]

Dendrimery mají velmi výhodné vlastnosti, což je činí atraktivními pro mnoho biomedicínských odvětví. [30] Jsou to molekuly, které mají kontrolovatelnou velikost (3-10 nm), snadno lze do periferie navázat funkční skupiny, jsou vysoce rozpustné ve vodě [30], vykazují velmi nízkou vnitřní viskozitu [31], mají dobře definovanou chemickou strukturu a jsou biologicky kompatibilní. Bylo prokázáno, že poly(amidoamin) dendrimery (PAMAM) jsou výhodnější oproti lineárním polymerům díky jejich multivalenci. [30] Tyto dendrimery mají uvnitř své molekuly jakýsi prostor, který umožňuje inkorporaci malých chemických molekul a použití dendrimerů jakožto transportních jednotek je předmětem zkoumání. [31]

## 4.2 Syntéza dendrimerů

Ačkoliv bylo popsáno mnoho metod, jak lze syntetizovat molekuly dendrimeru, vždy se v podstatě jedná buď o metodu konvergentní, či divergentní. [26] Syntéza je však v obou případech velmi časově náročná a s každou vyšší generací se zvyšuje riziko vzniku strukturálních vad, což znamená, že monodisperzní dokonalý dendrimer může být ohrožen každým dalším reakčním krokem. Je tedy zřejmé, že syntéza dendrimerů se snaží o co nejméně reakčních kroků, čímž se sníží nejen spotřeba výchozích materiálů a chemikálií, ale je to

především časově a nákladově efektivnější. [32] Chemie dendrimerů má také spoustu vlastních označení a zkratk. [29] Pokud jde o polymery, které se skládají z rozvětvených opakujících se jednotek, jsou tím myšleny buď dendrimery nebo tzv. „*hyperbranched polymers*“ (hyperrozvětvené polymery). Ty jsou obvykle produkty neinteraktivní polymerační procedury a vykazují nepravidelnou architekturu-viz obrázek č.9. [31] Mezi další specifická označení patří ku příkladu „*dendrigrfts*“ čili počestně dendrigrifty. Jedná se o skupinu dendritických molekul, které mohou být konstruovány s dobře definovanou molekulární strukturou (např. mohou být monodisperzní). Dendrigrifty narozdíl od dendrimerů připomínají strukturu palmy (větve kopolymerních řetězců jsou připojeny k řetězci lineárního polymeru). Dalším takovým termínem je již výše zmíněný dendron – jedná se o dendritickou molekulu bez jádra. Dendrony jsou velmi podstatné molekuly v konvergentní syntéze dendrimerů – viz další kapitola. Pokud jsou na jádro nabalovány vrstvy monomeru, vznikají tzv. generace. Například třetí generace dendrimery se značí jako G3. Jádrová část dendrimery je označována jako generace 0 = G0. Meziprodukty během syntézy jsou někdy značeny jako ½ generace. Například PAMAM dendrimery zakončené karboxylovou skupinou bývají někdy označovány jako poloviny generace. [29]



Obrázek č.9 – Rozdíl mezi strukturou hyperrozvětveného polymeru (*hyperbranched polymer*) a dendrimeru [31]

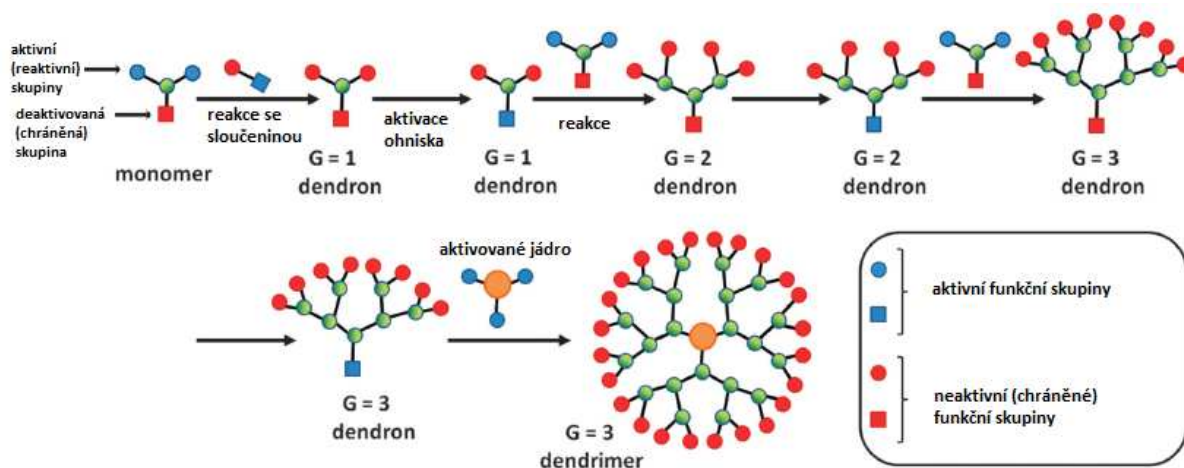
#### 4.2.1 Konvergentní syntéza dendrimerů

Konvergentní metodu syntézy dendrimerů poprvé představili Hawker a Fréchet v letech 1989-1990. [33] Smysl konvergentní metody spočívá v tom, že se nejprve syntetizuje ta část molekuly, která v konečném důsledku představuje obal (kůru, skořápku) dendrimery, a



následně se připojí jádro. [31] V prvé řadě se tedy syntetizují dokonale rozvětvené dendrony, které jsou poté po aktivaci ohniska spojeny s jádrem. Ve srovnání s divergentní metodou je monitorování růstu dendronů mnohem přímější, jelikož dendrony jsou daleko méně komplikované než dendrimery. Díky tomu je riziko strukturálních defektů u dendronů nižší. Avšak se zvýšenou velikostí dendronu se zase zmenšuje reaktivita a dostupnost ohniska kvůli stérickým vlivům. Hlavní nevýhodou konvergentní syntézy dendrimerů je tak ztráta hodnotné vysoké generace dendronů vedoucí k nižším výnosům u vyšších generací dendrimerů. To omezuje použití konvergentního růstu v produkci komerčních dendrimerů. [32]

K syntéze dendronů se používá konvenční monomer. Ten má aktivní (reaktivní) skupiny a deaktivovanou (chráněnou) skupinu. Monomer (respektive jeho reaktivní skupiny) je nejdříve podroben reakci se sloučeninou, jež naváže skupinu, která se nachází na periférii konečného dendrimeru. K syntéze dendronu G1 (čili dendron první generace) je obvykle klíčovým krokem zavedení chránících skupin funkčních zakončení. Následují další dva kroky, kterými jsou aktivace ohniska a spojení s monomerem, což vede k vytvoření dendronu další generace. Nakonec reakcí aktivovaných dendronů a aktivovaného jádra vzniká chtěný dendrimer – viz obrázek č.10. [23] Příkladem dendrimerů, které se syntetizují touto metodou, jsou poly(arylether) dendrimery. [34]



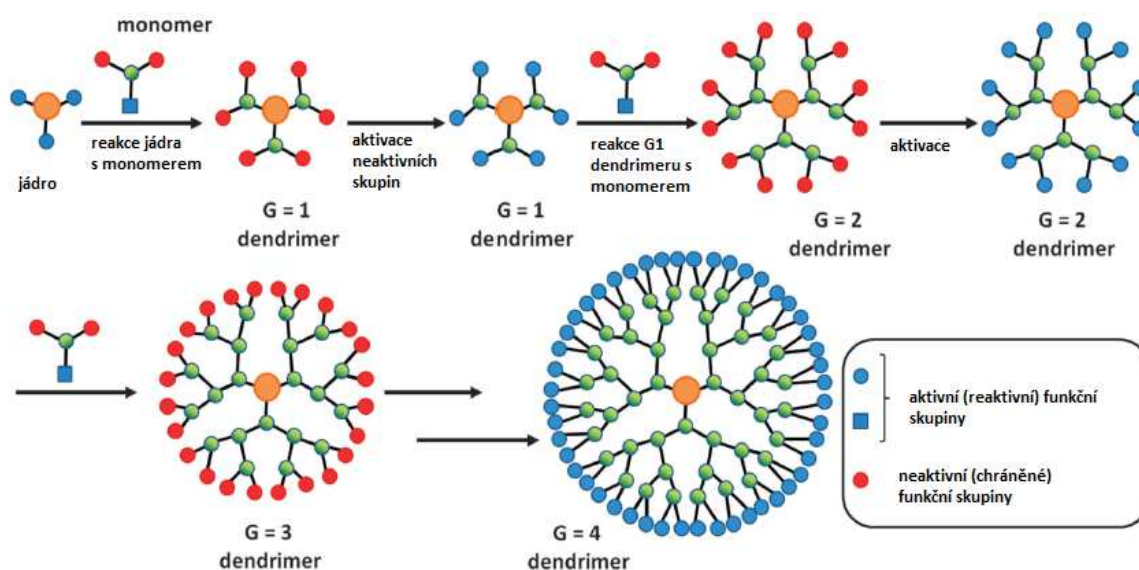
Obrázek č.10 – Konvergentní syntéza dendrimerů [23]

#### 4.2.2 Divergentní syntéza dendrimerů

Divergentní metoda spočívá v tom, že se postupuje tzv. zevnitř ven. Růst dendrimerů je totiž iniciován z multifunkčního jádra. Monomer, který se k syntéze používá, má aktivní (reaktivní) skupinu a deaktivované (chráněné) skupiny, aby byl zabezpečen řízený růst. Jedna

z aktivovaných skupin, které jsou obsaženy v jádře, reaguje s aktivními (reaktivními) skupinami monomeru za vzniku chemické vazby. Aktivace chráněných skupin může být provedena buď reakcí s jinou molekulou nebo odstraněním chránících skupin. Po navázání monomerů na jádro vzniká G1. G2 pak vznikne ve dvou krocích, a to sice aktivací neaktivních (chráněných) skupin G1 dendrimera a následnou reakcí s dalším monomerem. Pokud jsou tyto kroky znovu opakovány, vede to vždy k o generaci vyššímu dendrimera. [23] Vzhledem k tomu, že takto vzniklý dendrimer vlastně vzniká na jedné molekule, na které se dějí všechny následující reakce, každá reakce musí být vysoce selektivní, aby se zajistila integrita finálního produktu. Musí se tedy počítat s faktem, že procentuální výtěžky dokonalých dendrimerů bez defektů budou vcelku nízké. Navíc každá nová generace divergentně syntetizovaných dendrimerů lze hůře vyčistit, tudíž je v podstatě nemožné vyhnout se malému počtu statistických vad. [35]

Hlavní nevýhoda divergentní metody spočívá v riziku tvorby strukturálních vad, dendrimery se strukturální vadou navíc nelze oddělit od dokonalého dendrimera. [32] Pro příklad lze zmínit fakt, že v případě syntézy G5 poly(propylenimin) dendrimera vznikne pouze 29 % dendrimerů bez defektů, a to i za předpokladu, že selektivita každé reakce činí 99,5 %. [35] Zmíněné strukturální vady jsou výsledkem neúplných přeměn všech koncových skupin, ke kterým dochází kvůli sterickým vlivům u vyšších generací dendrimerů. Nicméně většina komerčně dostupných dendrimerů je syntetizována právě divergentní metodou, jelikož k této metodě je zapotřebí pouze nadbytek monomeru a činidel, což jsou finančně dostupné složky. [23]



Obrázek č. 11 – Divergentní syntéza dendrimerů [23]

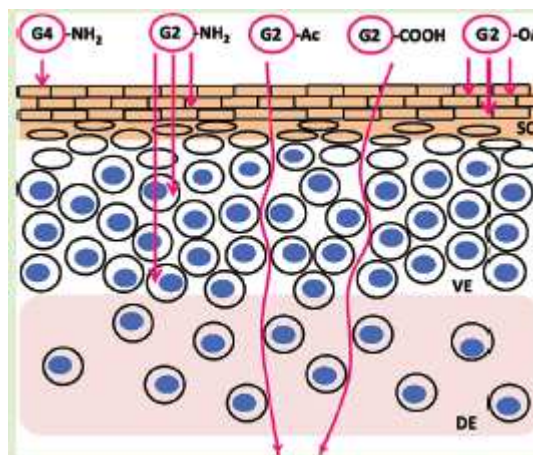
### 4.3 Použití dendrimerů ke kožní aplikaci

Prvním příkladem aplikace dendrimerů na kůži je při léčbě popálenin. [36] Kyselina třísllová pozitivně ovlivňuje zánět a reepitelizaci jizvové tkáně, avšak jejím negativem je nestabilita ve farmaceutických formulacích. Syntéza jejich analogů, a to sice polygalloyl-dendrimerů, s vyšší stabilitou a nízkou biologickou aktivitou je tedy možné řešení. [36]

Dalším příkladem aplikace dendrimerů na kůži je transdermální podání léčiv. Studie potvrzují interakci mezi dendrimery a lipidovou dvojvrstvou či buněčnou membránou. Pozitivně nabitý PAMAM dendrimer indukují tvorbu otvůrků. Díky tomu se začaly zkoumat jako molekuly, které jsou schopné pronikat kůží čili by mohly být použity jako enhancery kožní permeace. [29] Některé studie uvedly, že PAMAM dendrimery zvyšují kožní propustnost nesteroidních protizánětlivých léků (NSAIDs) [30] ketoprofenu a diflunisalu [37] a také hydrofilního léčiva 5-fluorouracilu (5-FU). [38] U posledně zmíněného léčiva bylo dokázáno, že se permeace zvyšuje s použitím G4 a G3,5 PAMAM dendrimerů s různými navázanými skupinami. Pořadí podle zlepšení koeficientu propustnosti ( $K_p$ ) zní následovně:  $G4-NH_2 > G4-OH > G3,5-COOH$ . [30] Koeficient propustnosti je také nepřímo úměrný k molekulové hmotnosti dendrimeru [38], z čehož vyplývá, že aminem zakončené malé PAMAM dendrimery jsou účinnější ve zvýšení kožní penetrace malých molekul léčiva než jiné typy dendrimerů. Avšak je nutné podotknout několik dalších důležitých faktů. Za prvé, většina pokusů se zaměřovala na pronikání malých molekul léčiva do kůže, aniž by byly provedeny systematické experimenty, jak s kůží interagují samotné molekuly dendrimerů (zejména nižší generace). To je nezbytné pro lepší porozumění a potenciální klinické využití transdermálních formulací léčiv založených na dendrimerech. [30] Dalším důležitým faktem je, že každá z prováděných permeací byla často podporována přidáním dalšího kožního enhanceru (např. isopropylmyristát, minerální olej) [38] či vytvořením komplexu s emulzí (s použitím cetylalkoholu a polysorbátu či Brij jako emulgátorů). Všechny studie navíc využily komplex dendrimer-molekula léčiva ke zvýšení rozpustnosti. [30]

Studie, která se přímo zaměřila na penetrační aktivitu G2 a G4 PAMAM dendrimerů v závislosti na velikosti dendrimeru, hydrofobicitě a povrchovém náboji, byla prováděna vždy se 3 modifikovanými dendrimery v každé generaci. Navázána byla v každé generaci aminoskupina jakožto terminální funkční skupina, acetyl a karboxyl. U G2 byla navázána navíc kyselina olejová kvůli regulaci hydrofobicity. Studie prokázaly, že G2-NH<sub>2</sub> PAMAM dendrimery pronikají do SC a živé epidermis, G2-NH<sub>2</sub> dendrimery v konjugaci s kyselinou

olejovou (G2-OA) se více absorbují a více jsou zadržovány v kůži. Při navázání acetylu (G2-Ac) a karboxylu (G2-COOH) se zvyšuje kožní permeace a je pravděpodobné, že tyto dendrimery difundují extracelulární cestou. Co se týče G4-NH<sub>2</sub> PAMAM dendrimerů, je možné konstatovat, že nepronikají dále než do vnější vrstvy SC – výsledky viz obrázek č.12. [30]



Obrázek č.12 – Znáznornění průniku dendrimerů skrz kůži [30]

# Experimentální část

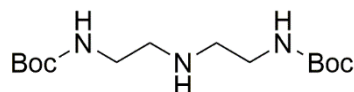
## 5. Použité přístroje, chemikálie a programy

Pro provedení experimentální části diplomové práce byly použity výchozí látky, rozpouštědla a další chemikálie dodané od firem: PENTA, Lach-Ner, Sigma Aldrich, VWR a Merc.

Na tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly používány desky dodané firmou Merck - Silica gel 60 F254. Pro detekci TLC byla používána UV lampa nebo roztok  $\text{KMnO}_4$  (1,5 g  $\text{KMnO}_4$ , 10 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  a 1,25 ml 10%  $\text{NaOH}$  v 200 ml vody) a deska byla vždy ihned zahřáta. Pro přečišťování byla použita sloupcová chromatografie, kde byl použit Silica gel 60 od firmy Merc. Látky byly určeny pomocí  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, MS,  $R_f$  a teplotou tání. Charakterizace látek pomocí  $^1\text{H}$  NMR byla provedena v deuterovaných rozpouštědlech za laboratorní teploty na přístroji Varian V S500 ( $^1\text{H}$  při 300MHz,  $^{13}\text{C}$  při 125MHz) nebo na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300 ( $^1\text{H}$  při 300 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 75,5MHz). Jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan. Hodnoty NMR spekter byly vyhodnocovány pomocí programu MestReC. Pro naměření IR spekter byl použit přístroj FTIR spektrometr (Nicolet 6700 FTIR) a to v rozmezí  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . MS spektra se zjistila pomocí metody Agilent Tech 500 Ionotrap s ESI, pokud to bylo potřeba. Hodnoty teplot tání byly naměřeny na přístroji Buchi Melting Point B540 s použitím otevřených kapilár. Uváděné hodnoty nejsou korigované. HPLC analýza (permeační pokus) proběhla na přístroji Schimadzu Prominence. Vzorce použité v diplomové práci byly vytvořeny v chemickém programu ChemDraw Professional. Vyhodnocení a statistická analýza byly provedeny v programu GraphPad Prism 8.

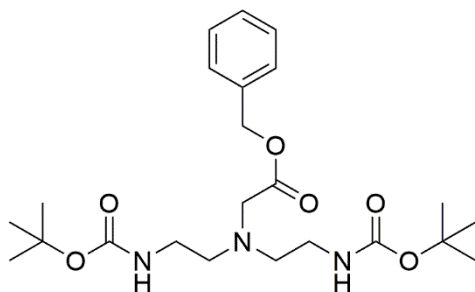
## 6. Syntéza

### 6.1 Syntéza *N,N''*-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminu



6 g imidazolu (88 mmol, 2,0 eq) bylo nejprve rozpuštěno v 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Potom za stálého míchání bylo přidáváno 20 g Boc<sub>2</sub>O (93 mmol, 2,1 eq). Směs se míchala 1 h, potom se odpařil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na odparce a směs se nechala 1 h vysušit pod olejovou pumpou. Poté bylo přidáno 20 ml toluenu a 4,75 ml diethylenetriaminu (1,0 eq, 44 mmol). Reakce byla míchána 14 h při 60 °C. Poté byla směs zchlazena na laboratorní teplotu, přidalo se 125 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a extrahovalo se s H<sub>2</sub>O (3x50 mL). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a bylo odpařeno přebytečné množství rozpouštědla. Výsledná směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100/1, která byla během eluce postupně změněna na 30/1). Bylo izolováno 10,8 g produktu (výtěžek 61 %). R<sub>f</sub> = 0,12 v CHCl<sub>3</sub>/MeOH (50/1). Mp: 70-72 °C. ESI-MS (m/z): 304.3 (M+1)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), δ/ppm: 4.94 (br, 1H), 3.20 (q, 4H, J=5.5 Hz), 2.71 (t, 4H, J=6.0 Hz), 1.43 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 156.1, 79.2, 48.8, 40.3, 28.4. IR (ATR) 3322, 2974, 2933, 2820, 1671, 1541, 1281, 1163.

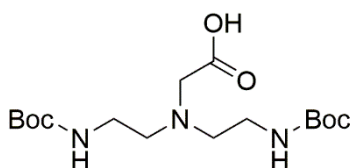
### 6.2 Syntéza *N,N''*-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyl-*N'*-[glycinbenzyl ester]



10,73 g *N,N''*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl) diethylenetriaminu (35 mmol, 1 eq) bylo rozpuštěno v 120 ml DMF, následně bylo přidáno 5,67 ml benzylobromoacetátu (35 mmol, 1 eq)

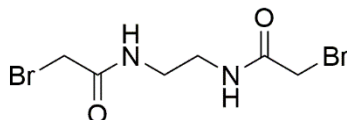
a 5,98 ml triethylaminu (43 mmol, 1,2 eq). Reakce byla takto ponechaná 14 h za laboratorní teploty. Po zreagování se ke směsi přidalo 400 ml EtOAc a proběhla extrakce nasyceným roztokem NaCl (300 mL) a nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2x200 mL). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a bylo odpařeno přebytečné množství rozpouštědla. Produkt byl následně vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100/1). Byly izolovány 2,0 g produktu (výtěžek 13 %). R<sub>f</sub> = 0,3 v CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100/1). Mp: 54-56 °C. ESI-MS (m/z): 374.4 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz), δ/ppm: 7.32 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.14 (q, 4H, J=5.0 Hz), 2.73 (t, 4H, J=5.5 Hz), 1.44 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 171.7, 156.4, 135.8, 128.9, 128.7, 128.6, 77.8, 66.7, 55.4, 54.4, 38.9, 28.7. IR (ATR) 3368, 2974, 1745, 1696, 1564, 1526, 1506, 1163, 1145. [39]

### 6.3 Syntéza N,N''-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyl-N'-glycinu



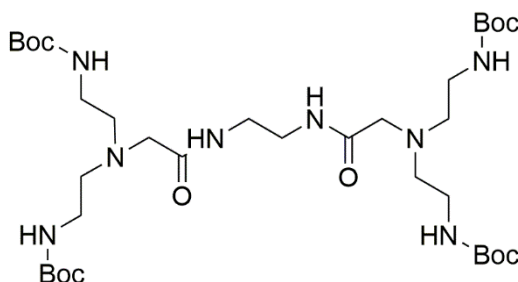
2,1 g N,N''-bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyl-N'-[glycin-benzylesteru] (4,65 mmol) bylo rozpuštěno v 50 ml MeOH. Poté se přidala směs 0,5 g Pd/C (10 %) s 10 ml MeOH. Pomocí kohoutku byl připojen k baňce balonek s H<sub>2</sub>. Takto reakce probíhala 4 h za laboratorní teploty. Po uplynutí daného času se směs zfiltrovala přes Celite a poté se propláchla MeOH. Dále byla směs dána na vakuovou odparku pro odstranění rozpouštědla. Následně se přidal ether, pokračovalo se filtrací a úplným vysušením produktu pod olejovou pumpou. Produkt činil 1,58 g (94% výtěžek). R<sub>f</sub> = 0,65 v MeOH. Mp: 163-165 °C. ESI-MS (m/z): 384,3 (M+Na)<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz), δ/ppm: 3.85 (s, 2H), 3.20 (bs, 4H), 3.10 (bs, 4H), 3.10 (bs, 4H), 1.38 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) δ 155.6, 78.0, 53.3, 53.1, 36.0, 28.1. IR (ATR) 3348, 2977, 2925, 1748, 1693, 1630, 1522, 1379, 1366, 1293, 1249, 1168. [39]

## 6.4 Syntéza 1,2-Bis(bromoacetylamino)ethanu



Do baňky se dvěma přívody se napipetovalo 6,68 ml ethylendiaminu (0,1 mol, 1eq) a 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Poté se současně přikapávaly dva roztoky, prvním z nich byl roztok 33 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,24 mol, 2,4 eq) ve 120 ml H<sub>2</sub>O a druhým byl roztok 26 ml bromoacetylbromidu (0,3 mol, 3 eq) ve 120 ml CHCl<sub>3</sub>. Jakmile se tyto dva roztoky přikapaly, nechala se směs reagovat 12 h za laboratorní teploty. Reakcí vznikly 2 fáze a výsledný produkt byl ve fázi organické. Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, následně se provedla filtrace. U vodné fáze se provedla extrakce s AcOEt, následovalo opět sušení pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a filtrace. Tyto frakce se spojily a byly dány na vakuovou odparku pro odstranění rozpouštědla. Poté proběhla rekrystalizace s EtOH. Výsledný produkt vážil 27 g (90 % výtěžek). R<sub>f</sub> = 0,16 v CHCl<sub>3</sub>/MeOH (50/1). Mp: 149-151 °C. ESI-MS (m/z): 302.9 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ/ppm: 7.26 (bs, 2H), 3.19 (s, 4H), 2.97 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), δ 166.5, 40.0, 29.6. IR (ATR) 3294, 2938, 2860, 1645, 1542, 1480. [40, 41]

## 6.5 Syntéza N,N'-Bis[(bis{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]ethyl}amino) acetyl]-1,2-diaminoethane, G0-Boc

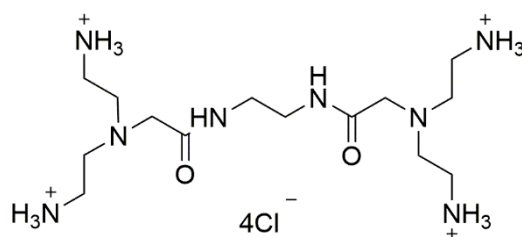


5,2 g N,N'-Bis(*tert*-butoxycarbonyl) diethylenetriaminu (17,0 mmol, 2 eq) bylo rozpuštěno ve 100ml AcOEt. Do baňky bylo přidáno 2,56 g 1,2-bis(bromoacetylamino)ethanu (8,5 mmol, 1eq) a roztok 3,55 g uhličitany draselného (25,5 mmol, 3eq) ve 25ml vody. Směs se nechala reagovat 14 h pod zpětným chladičem a potom byla vyextrahována s vodou (2x100 ml), vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Výsledná směs



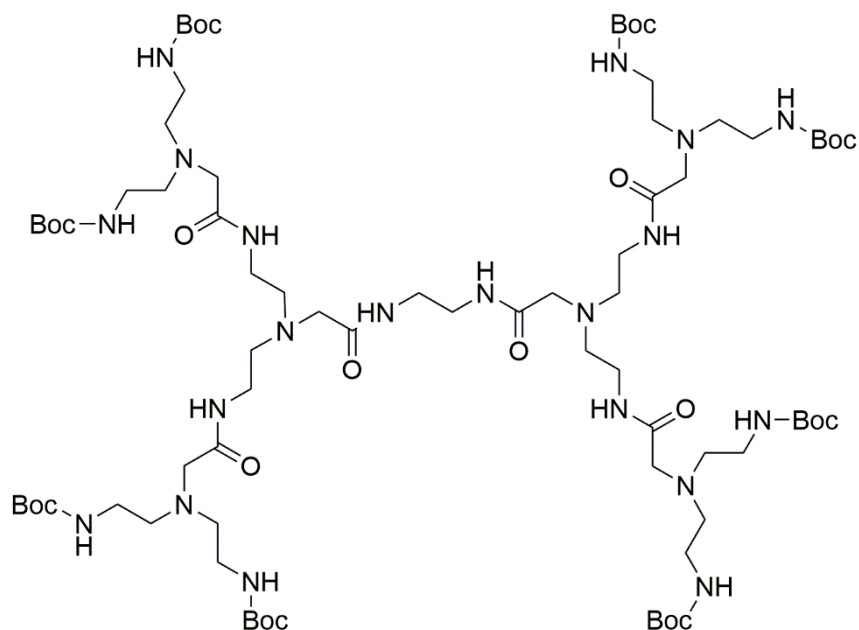
byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (20/1). Bylo izolováno 4,3 g produktu (výtěžek 67 %).  $R_f = 0,55$  v  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (10/1). Mp: 148-150 °C. ESI-MS (m/z): 769.7 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz),  $\delta/\text{ppm}$ : 7.23, (bs, 2H), 6.31 (bs, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.16 (m, 8H), 2.97 (s, 4H), 2.45 (m, 8H), 1.85 (s, 36H). <sup>13</sup>C NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  171.7, 156.8, 79.1, 58.3, 55.0, 38.8, 38.4, 28.54. IR (ATR) 3370, 3285, 2979, 2943, 2827, 1685, 1655, 1564, 1521, 1277, 1211, 1174.

## 6.6 Syntéza chlorovodíkové soli nulté generace, G0-HCl



1,84 g G0-Boc (1,1 mmol, 1 eq) bylo rozpuštěno v 90 ml 4M HCl v dioxanu (360 mmol, 300 eq) a reakce byla míchána za pokojové teploty 20 h. Po uplynutí doby se dala baňka na vakuovou odparku pro odpaření rozpouštědla a následně pro úplné vysušení na olejovou pumpu. Produkt činil 1,19 g (98 % výtěžek). Mp: 150-153 °C. <sup>1</sup>H NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz),  $\delta/\text{ppm}$ : 3.63 (s, 4H), 3.28 (s, 4H), 3.24 (t, 8H, J=6.0 Hz), 3.14 (t, 8H, J=6.0 Hz), 2,21 (s, 12H). <sup>13</sup>C NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz)  $\delta$  171.1, 56.0, 51.9, 38.6, 36.2, 30.2. IR (ATR) 3352, 3104, 1658, 1550, 1210, 1180, 1141

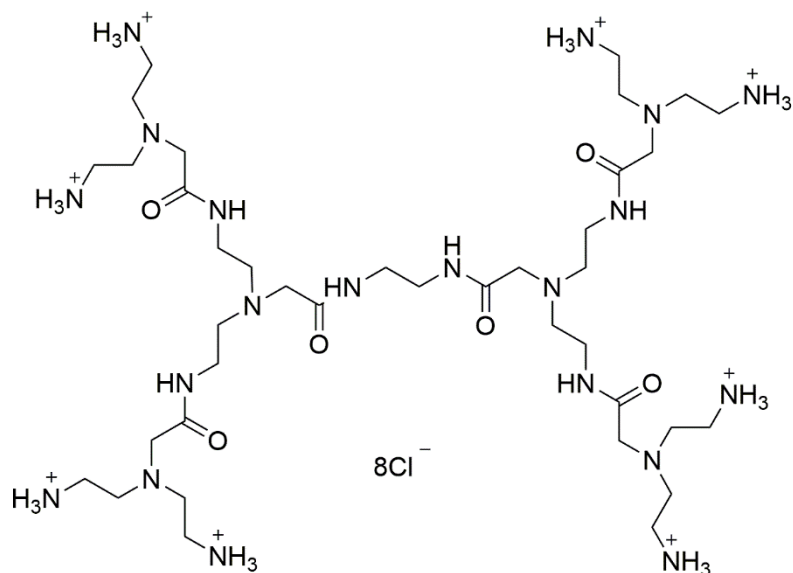
## 6.7 Syntéza Boc chráněné první generace dendrimeru, G1-Boc



0,10 g G0-HCl (0,2 mmol, 1 eq) se nechalo rozpustit ve směsi tvořené 5 ml DMF a 4 ml DMSO a poté byl roztok zchlazen na 0 °C. Po ochlazení se přidalo 0,4 ml DIEA (2,0 mmol, 10 eq) a dané reaktanty se nechaly za chladu míchat 15 min. Po 15 min se přidalo 0,36 g N,N''-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyln'-glycinu (1,0 mmol, 5 eq), 0,38 g HBTU (1,0 mmol, 5 eq), a 0,18 g HOBt hydrátu (1,0 mmol, 5 eq). Směs se nechala reagovat 14 h za laboratorní teploty. Po proběhlé reakci bylo přidáno 120 ml CHCl<sub>3</sub> a následně se provedla extrakce se 40 ml H<sub>2</sub>O a 40 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub>, tato extrakce se provedla dvakrát. Poté byla provedena další extrakce s 25 ml H<sub>2</sub>O a 25 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (2x, aby byla jistota, že se rozpouštědla DMF a DMSO odstraní co možná nejvíce). Následně se organická fáze nechala vysušit pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dále se produkt zfiltraval a byl dán na vakuovou odparku pro odstranění zbytku rozpouštědla. Produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Použitá mobilní fáze byla směs CHCl<sub>3</sub>/MeOH v poměru 20/1 a v průběhu eluce byla mobilní fáze měněna na polárnější (10/1). Produkt činil 320 mg (výtěžek 89 %). R<sub>f</sub> = 0,25 v CHCl<sub>2</sub>/MeOH (10:1). Mp: 89-91 °C. ESI-MS (m/z): 882.7 (M+2Na)<sup>2+</sup>, 1742,1 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz), δ/ppm: 7.71, (bs, 2H), 6.23 (bs, 4H), 6.02 (bs, 8H), 3.47 (s, 4H), 3.31 (q, 8H, J=6 Hz), 3.21 (bs, 4H), 3.17 (m, 16H) 3.11 (bs, 8H), 2.67 (bs, 8H), 2.59 (bs, 16H), 1.43 (s, 72H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 171.93, 156.61, 79.09, 59.08, 55.58,

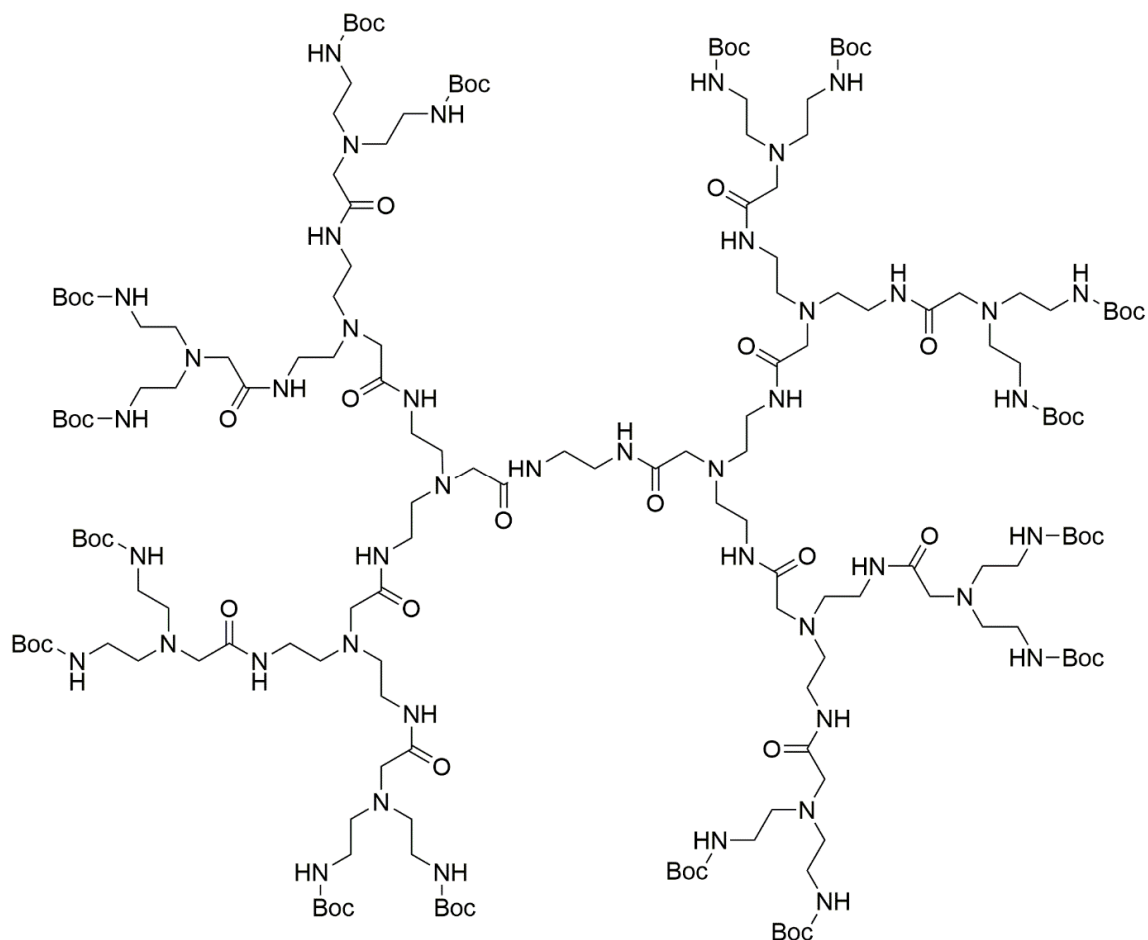
55.06, 39.83, 39.17, 38.61, 37.89, 28.49. IR (ATR) 3318, 2977, 2933, 1691, 1660, 1527, 1274, 1251, 1169.

## 6.8 Syntéza chlorovodíkové soli první generace, G1-HCl



Do baňky s G1-Boc (2,2 mmol, 1 eq) se pomocí stříkačky přidalo 60 ml 4M HCl v dioxanu (220 mmol, 100 eq) (pod inertním plynem) a reakce se nechala míchat 14 h za laboratorní teploty. Po uplynutí doby se dala baňka na vakuovou odparku pro odpaření rozpouštědla a následně se pro úplné vysušení dala na olejovou pumpu. Produkt činil 2,64 g (výtěžek 99 %), Mp: 154-157 °C. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz), δ/ppm: 4.25 (s, 4H), 3.70 (t, 8H, J=6.0 Hz), 3.54 (t, 8H, J=6.0 Hz), 3.49 (s, 8H), 3.44 (s, 4H), 3.18 (t, 16H, J=6.5 Hz), 2.98 (t, 16H, J=6.5 Hz). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz) δ 174.5, 165.6, 56.5, 55.4, 54.9, 52.0, 38.9, 37.1, 34.7, 30.6. IR (ATR) 3071, 1681, 1541, 1203, 1131.

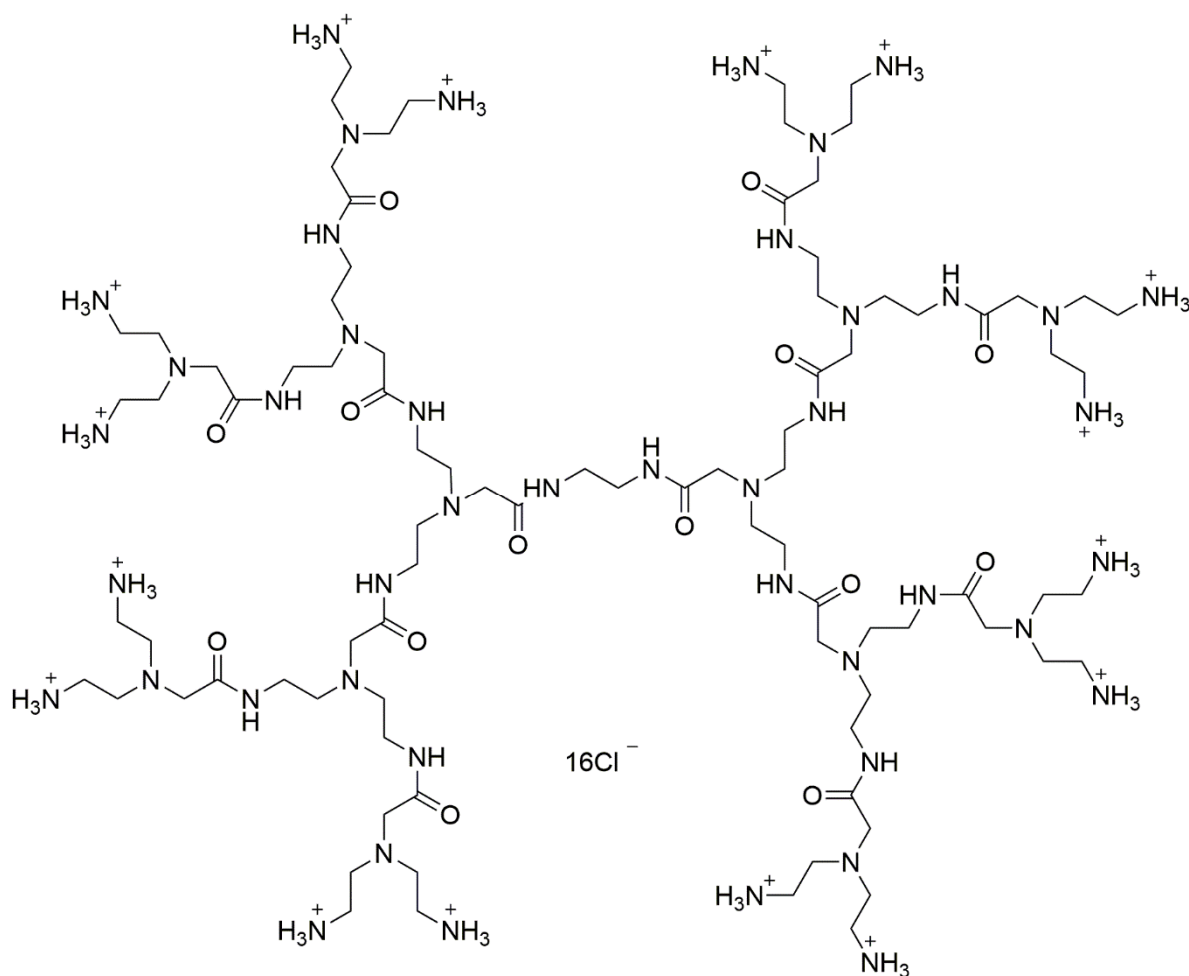
## 6.9 Syntéza Boc chráněné druhé generace dendrimeru, G2-Boc



2,7 g G1-HCl (2,3 mmol, 1 eq) bylo rozpuštěno v 70 ml DMSO. Následně byla směs ochlazena na 0 °C a poté se přidalo 7,8 ml DIEA (44,8 mmol, 20 eq). Za těchto podmínek byla směs míchána 15 minut. Po 15 minutách se přidalo ke směsi 8,1 g N,N''-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyl-N'-glycinu (23 mmol, 10 eq) rozpuštěného v 10 ml DMSO, 8,2 g HBTU (23 mmol, 10 eq) a 3,9 g HOBt hydrátu (23 mmol, 10 eq). Směs se nechala reagovat 18 h za laboratorní teploty. Po uplynutí daného času se baňka se směsí dala na vakuovou odpárku pro odpaření co největšího množství DMSO. Poté se přidalo 600 ml CHCl<sub>3</sub> a byla prováděna extrakce se 100 ml H<sub>2</sub>O a 100 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Extrakce se takto provedla celkem třikrát. Následně byl produkt dán na vakuovou odpárku pro odstranění rozpouštědla a poté pro úplné vysušení na olejovou pumpu. Čištění bylo provedeno pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10/1). Výsledný produkt činil 3,37 g (výtěžek 40,71 %). R<sub>f</sub> = 0,3 v CHCl<sub>3</sub>/MeOH (7/1). Mp: 124-126 °C. ESI-MS (m/z): 1244,9 (M+3Na)<sup>3+</sup>, 1855,7 (M+2Na)<sup>2+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ/ppm: 3.29 (m, 40H), 3.24

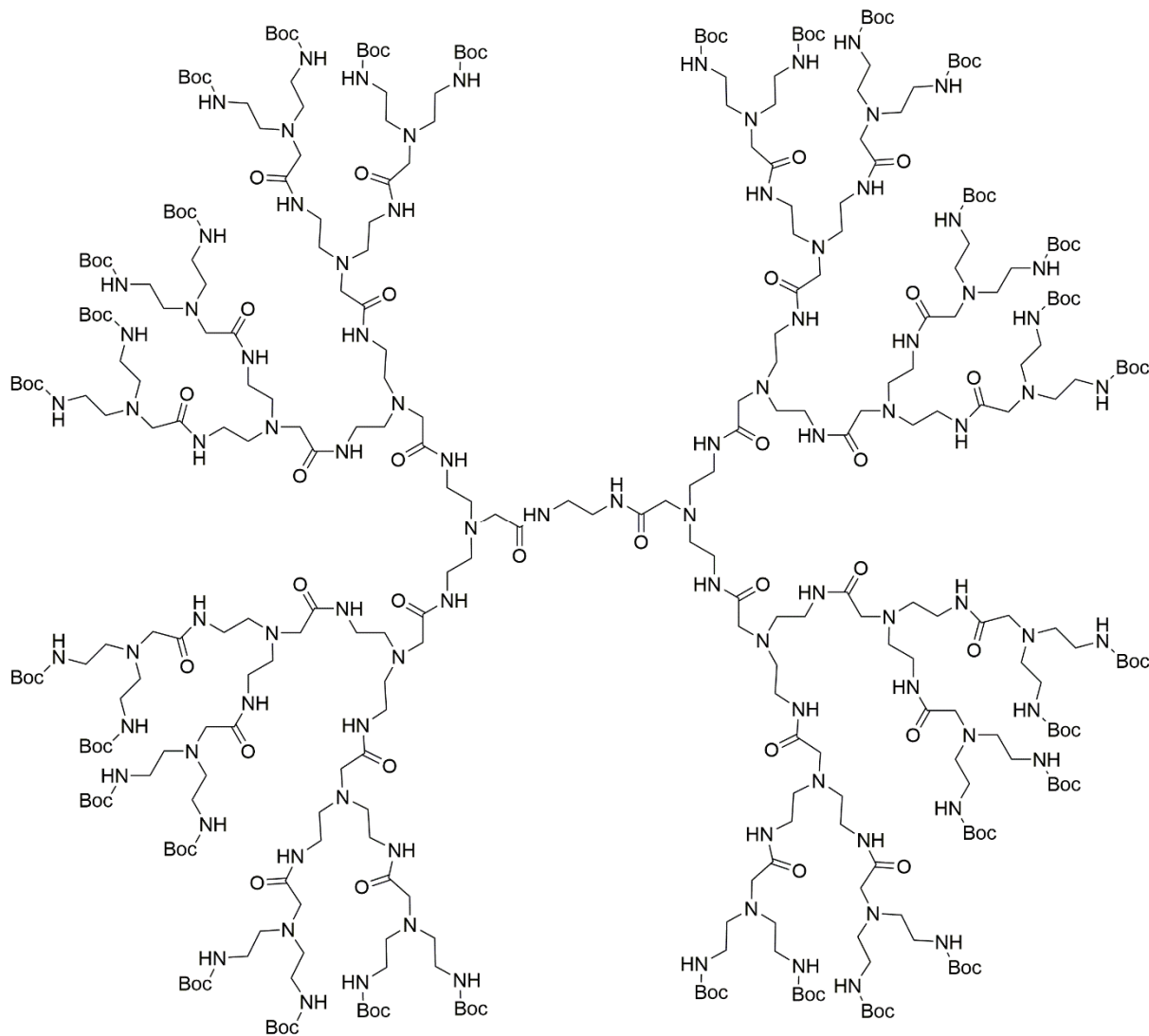
(bs, 16H), 3.16 (s, 16H), 3.11 (s, 16H), 2.69 (m, 24H), 2.57 (s, 32H), 1.42 (s, 144H).  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  171.9, 156.6, 79.0, 59.1, 55.5, 39.7, 38.6, 37.8, 28.5. IR (ATR) 3307, 2974, 2931, 1691, 1659, 1525, 1274, 1251, 1171

## 6.10 Syntéza chlorovodíkové soli druhé generace, G2-HCl



Do baňky s 2,4 g G2-Boc (0,64 mmol, 1 eq) se pomocí stříkačky přidalo 50 ml 4M HCl (200 mmol, 300 eq) (pod inertním plynem) a reakce se nechala míchat 14 h za laboratorní teploty. Po uplynutí doby se dala baňka na vakuovou odparku pro odpaření rozpouštědla a následně se pro úplné vysušení dala na olejovou pumpu. Produkt činil 1,7 g (výtěžek 99 %). Mp: 180-183 °C.  $^1\text{H}$  NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz),  $\delta$ /ppm: 4.29 (s, 8H), 4.25 (s, 4H), 3.75 (s, 16H), 3.70 (t, 16H, J=6.0 Hz), 3.62 (s, 16H), 3.55 (m, 24H), 3.43 (s, 4H), 3.23 (t, 32H, J=6.5 Hz), 3.09 (t, 32H, J=6.5 Hz), 2.21 (s, 48H).  $^{13}\text{C}$  NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz)  $\delta$  173.4, 166.4, 165.6, 67.2, 56.7, 55.7, 54.9, 54.3, 52.4, 37.1, 35.0, 30.9. IR (ATR) 2991, 1668, 1541, 1203, 1130.

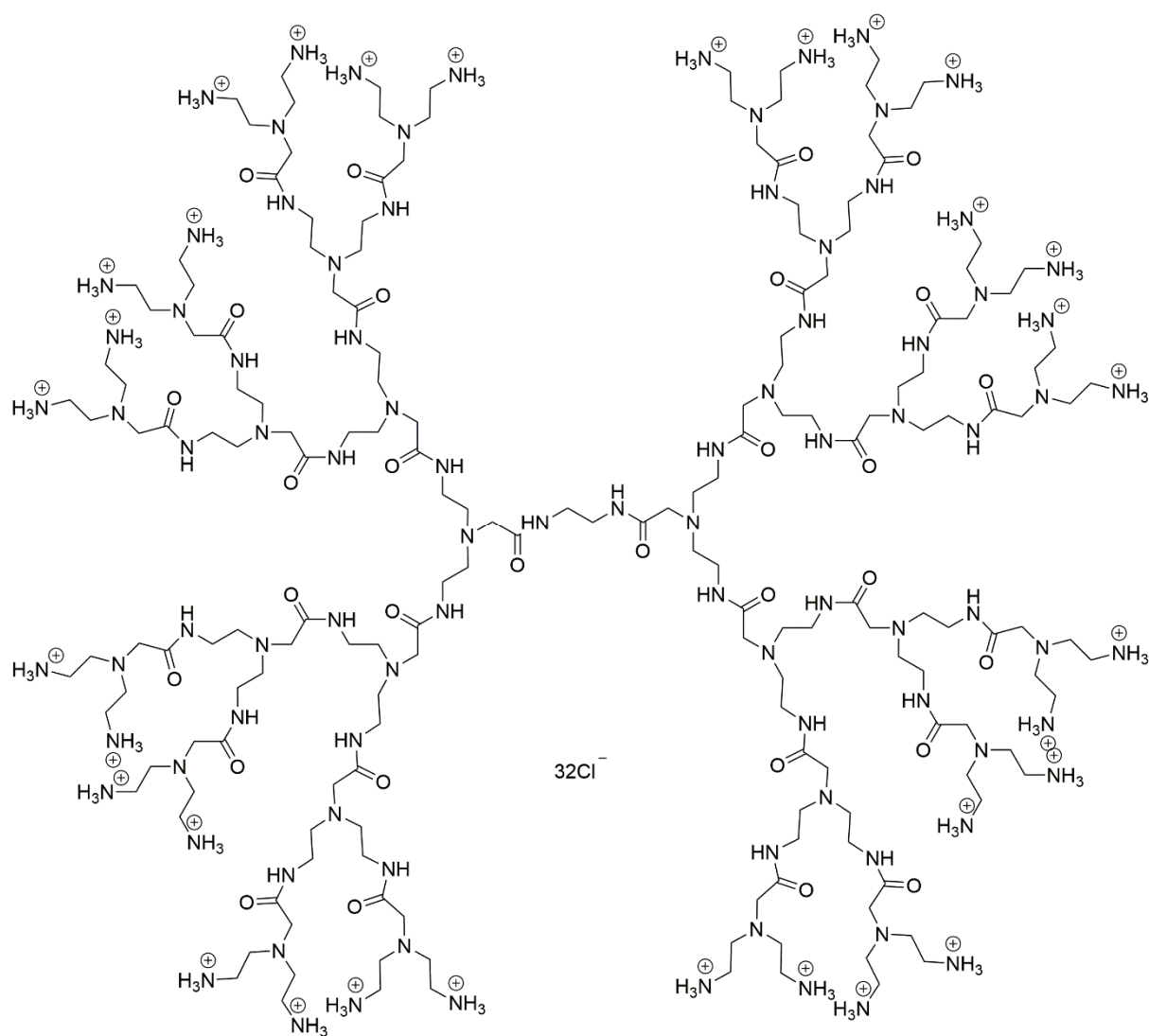
## 6.11 Syntéza Boc chráněné třetí generace dendrimeru, G3-Boc



1,8 g G2-HCl (0,7 mmol, 1 eq) bylo rozpuštěno ve 35 ml DMSO a směs byla zchlazena na 0°C. Následně bylo přidáno 4,8 ml DIEA (27,6 mmol, 40 eq) a za těchto podmínek se směs nechala míchat 15 min. Po uplynutí 15 min se do baňky přidalo 4,8 g N,N'-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)diethylenetriaminyln'-glycinu (14 mmol, 20 eq) rozpuštěného v 10 ml DMSO, 5,0 g HBTU (14 mmol, 20 eq) a 2,3 g HOBt hydrátu (14 mmol, 20 eq). Směs se nechala reagovat 26 h. Po zreagování bylo do směsi přidáno 10 ml toluenu a směs byla dána na vakuovou odparku (toluen vytvořil azeotropní směs a rozpouštědlo bylo lépe a rychleji odpařitelné). Poté bylo přidáno 500 ml CHCl<sub>3</sub> a byla provedena extrakce s 200 ml H<sub>2</sub>O a 200 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Takto byla extrakce provedena celkem třikrát. Následně se

odstranila přebytečná voda pomocí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , směs se zfiltrovala a dále byla dána na vakuovou odparku pro odstranění rozpouštědla. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie v mobilní fázi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  v poměru 10/1 (v průběhu eluce měněno na polárnější mobilní fázi 10/1  $\rightarrow$  5/1  $\rightarrow$  3/1). Výsledný produkt činil 1,7 g (výtěžek 32,1 %).  $R_f = 0,1$  (ve směsi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  v poměru 5/1). Mp: 119-121 °C. ESI-MS (m/z): 706.2 ( $\text{M}+9\text{Na}+2\text{H}$ )<sup>11+</sup>. <sup>1</sup>H NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz),  $\delta$ /ppm: 3.36-3.05 (m, 184H), 2.67 (m, 56H), 2.57 (s, 64H), 1.40 (s, 288H). <sup>13</sup>C NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  171.9, 156.6, 79.0, 58.2, 55.4, 55.0, 40.0, 38.6, 37.7, 37.5, 28.5. IR (ATR) 3311, 2979, 2936, 1690, 1660, 1526, 1274, 1249, 1171

## 6.12 Syntéza chlorovodíkové soli třetí generace, G3-HCl



Do baňky s 1,6 G3-Boc (0,2 mmol, 1 eq) se pomocí stříkačky přidalo 100 ml 4M HCl (400 mmol, 2000 eq) (pod inertním plynem) a reakce se nechala míchat 24 h za laboratorní teploty. Po uplynutí doby se dala baňka na vakuovou odparku pro odpaření rozpouštědla a následně se pro úplné vysušení dala na olejovou pumpu. Produkt činil 1,17 g (výtěžek 99 %). Mp: 207-210 °C. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 600 MHz), δ/ppm: 3.80 – 3,65 (m, 84H), 3.62 - 3.55 (m, 92H), 3.23 (t, 64H, J=6.0 Hz), 3.07 (t, 64H, J=6.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz) δ 173.9, 166.3, 166,2, 165.6, 72.2, 71.3, 67.2, 63.2, 60.9, 56.9, 55.7, 55.0, 54.1, 52.4, 43.9, 37.3, 35.0, 30.9. IR (ATR) 3059, 1668, 1539, 1204, 1131

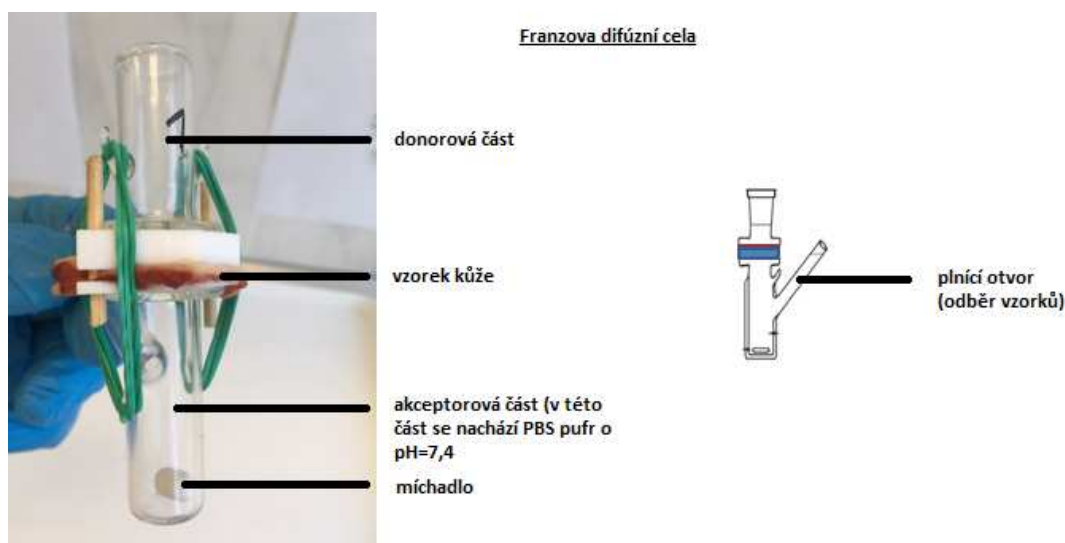


# 7. Permeace

## 7.1 *Ex vivo* permeační pokusy

Následovaly *ex vivo* permeační pokusy s výše nasyntetizovanými generacemi dendrimerů a léčivem 5-FU. Konkrétně byly provedeny pokusy s G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl a G3-HCl.

Pro *ex vivo* permeační pokusy byla využita kůže pacientů, kteří podstoupili abdominoplastiku v Prvním privátním chirurgickém centru s.r.o. Sanus v Hradci Králové. Veškerý proces odběru lidské kůže probíhal v souladu s pravidly schválenými Etickou komisí při Prvním privátním chirurgickém centru s.r.o. Sanus, Hradec Králové a dle principů Helsinské deklarace. Po transportu byl z kůže skalpelem odstraněn podkožní tuk, kůže byla omyta a osušena a skladována při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před experimentem byla kůže volně rozmrazena a nařezána na plochu velkou přibližně  $2 \times 2\text{ cm}^2$ . Kůže byla vložena epidermis nahoru mezi teflonové držáky (fixace silikonovou vazelínou), které byly uchyceny mezi donorovou a akceptorovou část Franzovy cely pomocí gumiček – viz obrázek č.13. Do spodní (akceptorové) části bylo umístěno magnetické míchadlo a tato část cely byla naplněna PBS o  $\text{pH}=7,4$  s přídavkem gentamicinu ( $0,005\text{g/l}$ ; antimikrobiální stabilita). Takto připravené cely byly umístěny na magnetický plát do vany s destilovanou vodou, kde proběhla ekvilibrace na  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  (cely byly na magnetickém plátu ponechány 10 h, do nanesení vzorků). Po celý čas experimentu byla udržována stálá teplota  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , což je teplota lidské kůže. [42]



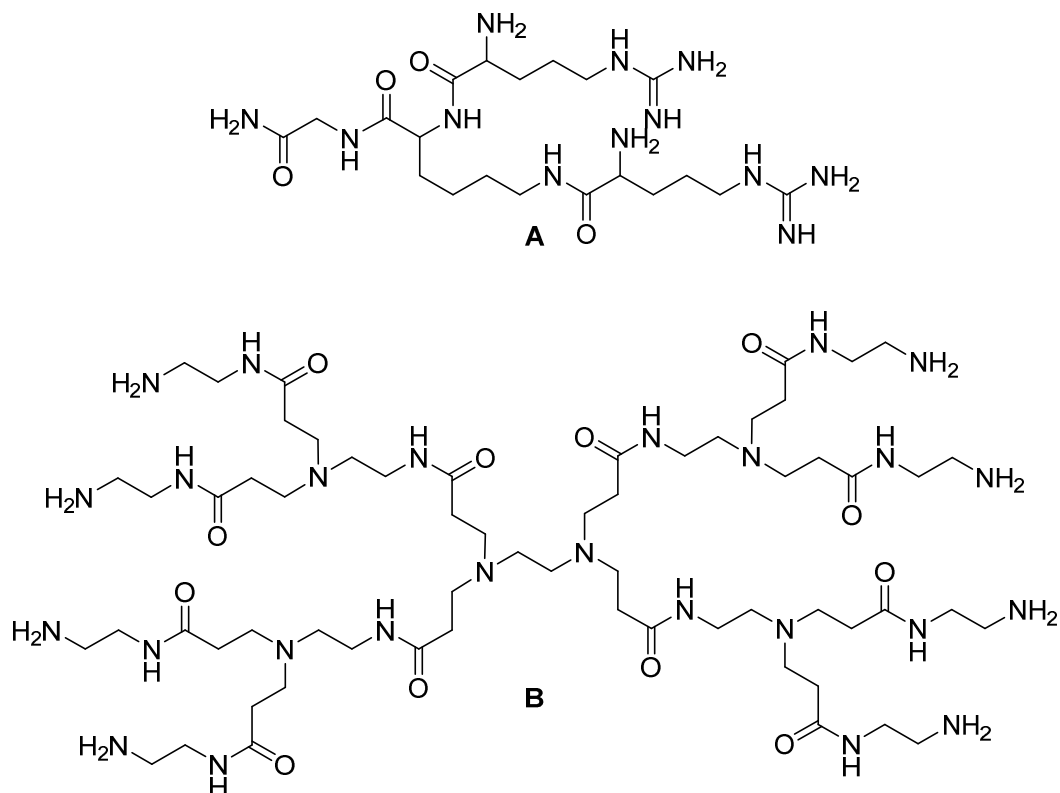
Obrázek č. 13 – Zobrazení Franzovy difúzní cely

Byly připraveny celkem 4 přípravky obsahující 5-FU a dendrimer G0, G1, G2 a G3 v roztoku 60% propylenglykolu (PG) v H<sub>2</sub>O. Koncentrace dendrimera v každém vzorku byla 20 mg/ml a koncentrace 5-FU byla 4,75 mg/ml. Jako kontrola byl použit roztok 5-FU v 60% PG stejné koncentrace. 100 ul každé formulace bylo aplikováno na kůži.

Každá formulace byla ponechána na kůži 24 h při teplotě 32 °C. Po 24 h byl odebrán vzorek akceptorové fáze (0,5 ml), cely byly rozebrány a dále se pracovalo s použitou kůží. Nejprve byla vyseknuta permeační plocha a zahřátím na 80 °C byla pomocí pinzet opatrně oddělena epidermis od dermis a obě části byly umístěny do vialky a zváženy. Následovala extrakce epidermis a dermis ve vialce s ACN. Epidermis byla vytřepávána se 2 ml ACN, dermis s 5 ml ACN po dobu 24 h. Poté bylo extrakční činidlo zfiltrováno přes vatku a proběhla analýza pomocí HPLC. Pro analýzu extraktů z epidermis a dermis byla použita následující metoda: použitá kolona byla ZIC-HILIC, 5 μm, 200 Å, 150×4,6 mm, teplota byla nastavena na 45 °C, jako mobilní fáze byla použita směs ACN/acetátový pufr v poměru 95/5 (2,5 mM, pH 4). Rychlost průtoku byla 0,75 ml/min, UV detekce probíhala při 264 nm, retenční čas 5-FU činil 5,3 min. Injekční objem byl 50 μL a rozsah kalibrační křivky byl 0,01-5 μg/ml ( $R^2=0,9998605$ ). Doba analýzy byla pro epidermis 15 min, pro dermis 30 min. Pro analýzu akceptorové fáze byla použita následující metoda: použitá kolona byla Lichrospher 250×4 mm, 5μm, teplota byla nastavena na 35 °C, jako mobilní fáze byla použita 5% MeOH v H<sub>2</sub>O. Rychlost průtoku byla 1 ml/min, UV detekce probíhala při 265 nm, retenční čas 5-FU činil 3,6 min. Injekční objem byl 50 μL a rozsah kalibrační křivky byl 0,05-50 μg/ml ( $R^2= 0,9999895$ ). Doba analýzy byla pro akceptorovou fázi 30 min.

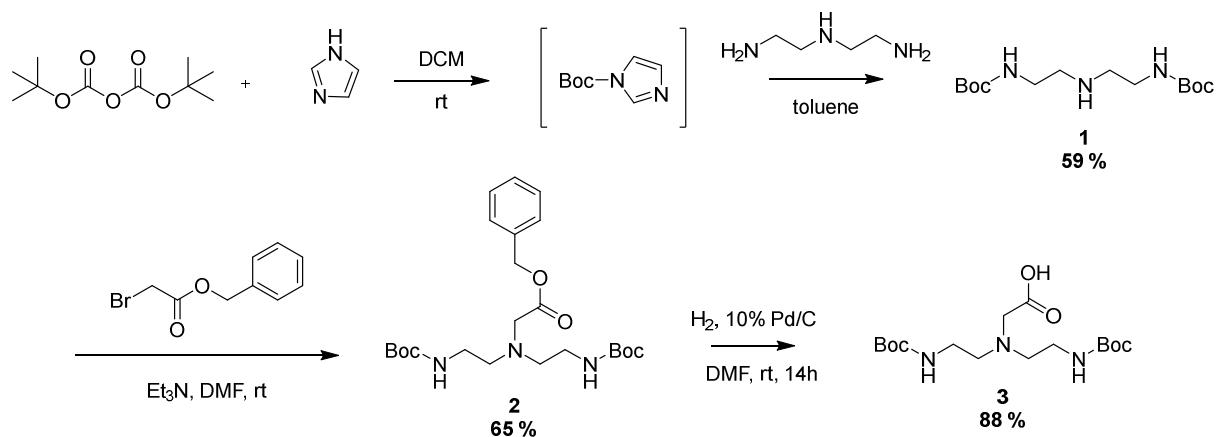
## Výsledky a diskuze

Schopnost dendrimerů zvyšovat ukládání a permeabilitu pro léčivé látky byla již prokázána a prezentována v teoretické části této práce. Protože peptidické dendrimery (obrázek č.14, struktura A) a PAMAM dendrimery (obrázek č. 14, struktura B) byly ve velké míře studovány jako enhancery (trans)dermální permeace [38, 43, 44], byly jejich struktury použity jako výchozí pro nové dendrimery, které by měly podobné vlastnosti, vhodné pro enhancery.



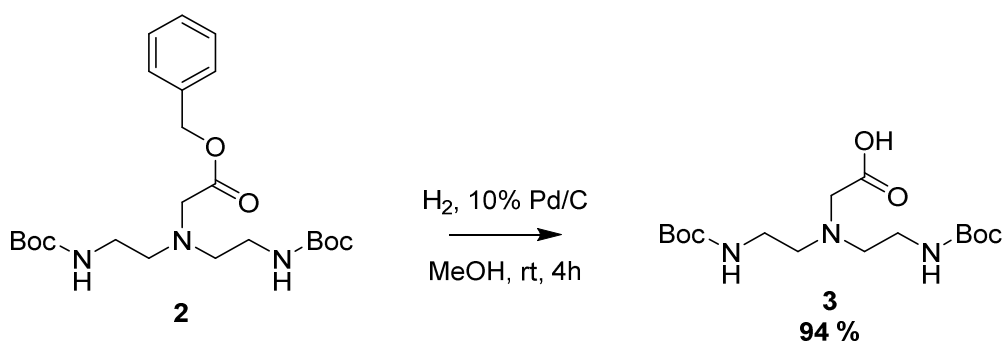
Obrázek č. 14 – Struktura peptidických (A) a PAMAM (B) dendrimerů

Speciální strukturální charakteristiky těchto molekul jsou (a) aminoskupiny na periferii, (b) amidové vazby propojující větve dendrimerů a (c) malý alifatický řetězec mezi funkčními skupinami. S ohledem na tyto vlastnosti byla během předešlé práce navržena nová série dendrimerů. [45] Díky tomuto primárnímu přístupu byly vyvinuty molekuly až do G3 přes speciálně postavený monomer bis(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethyl)glycin (viz obrázek č. 15 struktura 3). Tento monomer byl připraven třikrokovou syntézou (viz obrázek č. 15).



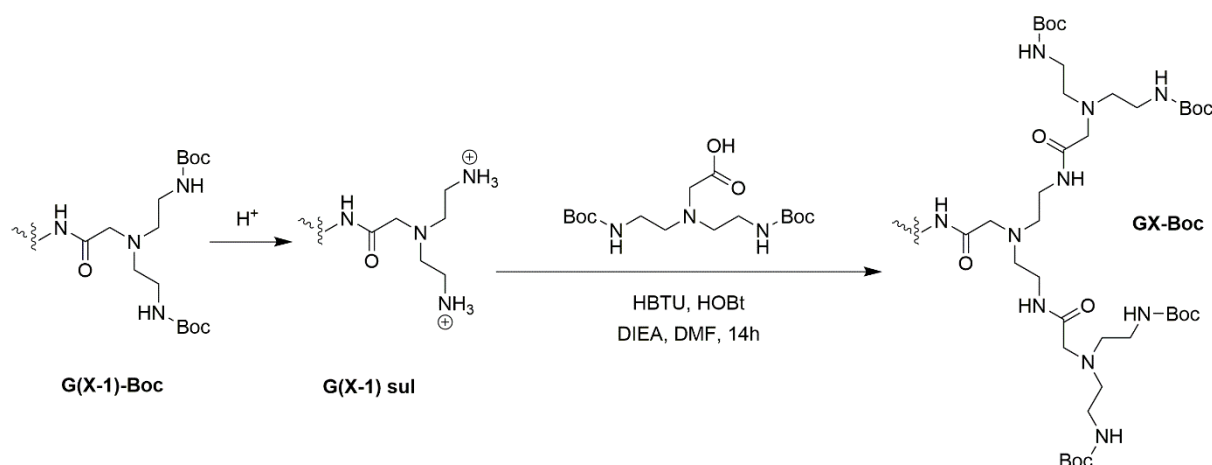
Obrázek č.15 – Syntéza monomeru bis(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethyl)glycinu

V této studii byl použit stejný monomer, ale syntéza se lišila finální hydrogenací. Tentokrát byl použit jako rozpouštědlo MeOH místo DMF (obrázek č. 16). Tato modifikace podmínek nejen zvýšila výtěžek reakce (94 % místo 88 %), ale také drasticky snížila čas reakce (4 h místo 14 h). Tyto změny byly nejspíše způsobeny lepší rozpustností vodíku v MeOH místo v DMF. [46] Na druhou stranu, bylo použito vysoce hořlavé rozpouštědlo (MeOH), což zvyšuje risk prováděné reakce a musí být zdůrazněno, že by měly být použity striktně inertní podmínky.



Obrázek č.16 – Zobrazení finálního kroku u syntézy monomeru bis(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethyl)glycinu

Pro růst generací dendrimerů byl následován dvou krokový proces. Nejprve byla molekula nižší generace převedena na amonnou sůl přes deprotekcí Boc – skupiny použitím kyseliny. Následovala konjugace amonné soli s monomerem přes tvorbu amidové vazby. Tato konjugace umožnila vznik struktury další generace, která má díky struktuře monomeru na periferii Boc- skupiny. Tyto skupiny na periferii mohou být pak dále odstraněny, a vzniklá sůl tak může znovu reagovat s monomerem a vytvořit další generaci. (viz obrázek č. 17)



Obrázek č.17 – Znárodnění deproteckce a konjugace s monomerem čili vznik následující generace dendrimerů

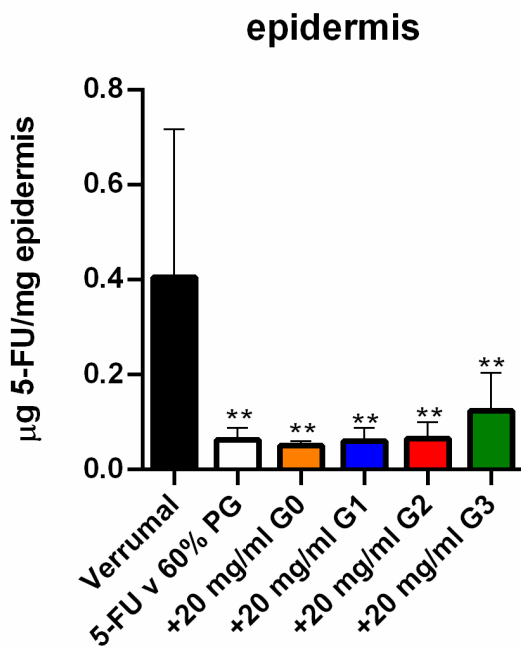
V předešlém přístupu byly Boc- skupiny odchráněny použitím trifluoroctové kyseliny (TFA), tudíž vznikla odpovídající TFA sůl. Tyto soli pak byly použity pro permeační pokusy na kůži. Avšak v literatuře byly nalezeny zmínky o cytotoxicitě trifluoroctového aniontu ( $TFA^-$ ). [47] Navíc nadbytek TFA může kvůli změně pH způsobit interakce s molekulami a modifikovat tak konformaci peptidů nebo proteinů. [48–50] Kvůli těmto komplikacím, které mohou  $TFA^-$  způsobovat, jsou jako alternativa pro použití během *in vitro* a *in vivo* studií navrhovány jiné druhy aniontů. [51] Jeden ze způsobů, jak předejít možným překážkám, je zaměnit  $TFA^-$  za biokompatibilní iont, jako např. chlorid ( $Cl^-$ ) nebo acetát ( $Ac^-$ ). V této práci bylo cílem syntetizovat a dále použít HCl soli molekul pro permeační experiment. Aby byly získány požadované HCl soli, Boc- deproteckce byla provedena použitím 4M HCl roztoku dioxanu. Všechny reakce pro Boc- deproteckci poskytly odpovídající soli ve vynikajících výtěžcích. Dále by mělo být zmíněno, že použití HCl solí pro růst generací (místo odpovídajících TFA solí) pozitivně ovlivnilo výtěžky následujících konjugačních reakcí. V tabulce č. 1 je uvedeno porovnání výtěžků po Boc- odchránění a vzniku amidových vazeb při použití předešlého a nynějšího přístupu.

Sloučenina	Výtěžek (%)	Sloučenina	Výtěžek (%)
G0-TFA	87	G0-HCl	98
G1-Boc	48	G1-Boc	89
G1-TFA	91	G1-HCl	99
G2-Boc	37	G2-Boc	40
G2-TFA	87	G2-HCl	99
G3-Boc	25	G3-Boc	32
G3-TFA	95	G3-HCl	99

Tabulka č. 1 – Porovnání výtěžků při použití nynějšího a předešlého postupu

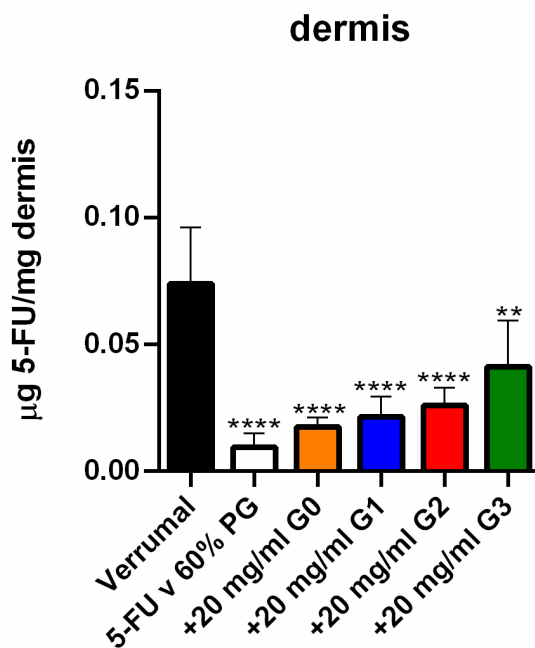
Po úspěšné syntéze požadovaných molekul až do G3, došlo k pokusu izolovat G4. I když se reakční směs nechala běžet tři dny za dříve úspěšných podmínek, získané spektroskopické údaje nemohly podpořit izolaci požadované dendritické molekuly G4. Selhání bylo přičítáno nedostatečně drastickým podmínkám. Molekuly vyšších generací mají na své periférii více funkčních skupin a konjugace monomeru je tak kvůli sterickým problémům obtížnější než pro generace nižší. Drastičtější podmínky, např. vyšší reakční teplota, by mohly být potenciálně prospěšné, ale reakce nebyla opakována, protože izolace molekuly G4 nebyla prioritou tohoto výzkumu. Přesto byl získán užitečný výsledek pro budoucí experimenty.

Poté co byly syntetizovány požadované HCl soli čtyř nižších generací dendrimerů (G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl a G3-HCl), byl proveden *ex vivo* permeační experiment. Pro tento experiment byl jako vehikulum použit 60% roztok PG v H<sub>2</sub>O. PG byl dříve používán v permeačních experimentech na kůži buď jako kosolvent špatně rozpustných léčiv [52] nebo jako enhancer pro přípravu topických přípravků. [53] Avšak přesný mechanismus působení PG jako enhanceru není dosud zcela objasněn. [54] V každém vzorku byla koncentrace 5-FU 4,75 mg/ml. Tato koncentrace byla zvolena, protože se jedná o koncentraci 5-FU ve Verrumalu, což je v České republice komerčně dostupný farmaceutický roztok 5-FU. Koncentrace dendrimerů byla 20 mg/ml. Jako kontrola byl použit roztok 4,75 mg/ml 5-FU v 60% PG v H<sub>2</sub>O a pro porovnání byl použit také Verrumal. Výsledky permeace léčiva do epidermis, dermis a akceptorové fáze jsou shrnuty v následujících grafech.



Obrázek č.18 – Graf znázorňující ukládání 5-FU v různých formulacích v epidermis

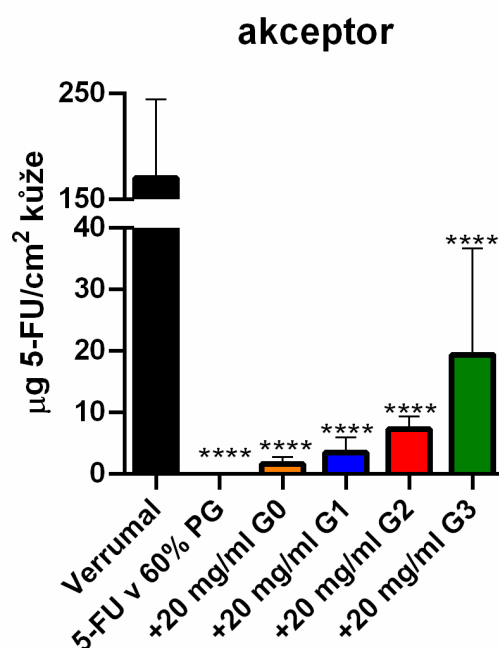
Graf na obrázku č. 18 představuje ukládání 5-FU v epidermis po aplikaci různých formulací. Verrumal doručil  $0,405 \pm 0,128 \mu\text{g}$  5-FU na mg tkáně, zatímco odpovídající hodnota pro kontrolní roztok byla  $0,062 \pm 0,011 \mu\text{g}$ . U přípravků obsahujících dendrimery byla zaznamenána depozice léčiva závislá na generaci. Konkrétně bylo zjištěno, že přípravky obsahující G0-HCI, G1-HCI, G2-HCI a G3-HCI doručily  $0,050 \pm 0,005$ ,  $0,060 \pm 0,014$ ,  $0,066 \pm 0,014$  a  $0,125 \pm 0,032 \mu\text{g}$  účinné látky na mg epidermis. Je evidentní, že formulace obsahující dendrimery nebyly schopny dodat do epidermis více účinné látky než komerčně dostupný farmaceutický roztok. Dále bylo zjištěno, že formulace obsahující dendrimery byly schopny dodat do epidermis srovnatelné množství 5-FU jako kontrolní formulace. Kromě toho byl zaznamenán rostoucí trend u formulací obsahujících dendrimer s růstem generací dendrimerů. Z toho lze usoudit, že tyto přípravky dodávají 5-FU do epidermis generačně závislým způsobem, i když rozdíly nejsou statisticky významné.



Obrázek č.19 – Graf znázorňující ukládání 5-FU v dermis

Graf na obrázku č. 19 představuje ukládání 5-FU v dermis. Verrumal doručil  $0,074 \pm 0,009 \mu\text{g}$  5-FU na mg tkáně, což bylo největší množství v porovnání s ostatními formulacemi. Kontrolní roztok 5-FU v 60% PG v  $\text{H}_2\text{O}$  uložil  $0,009 \pm 0,002 \mu\text{g}$  5-FU na mg tkáně, což bylo nejnižší doručené množství účinné látky do tkáně. U přípravků obsahujících dendrimery, podobně jako v epidermis, byla zaznamenána depozice léčiva závislá na generaci. Konkrétně bylo zjištěno, že přípravky obsahující G0-HCI, G1-HCI, G2-HCI a G3-HCI

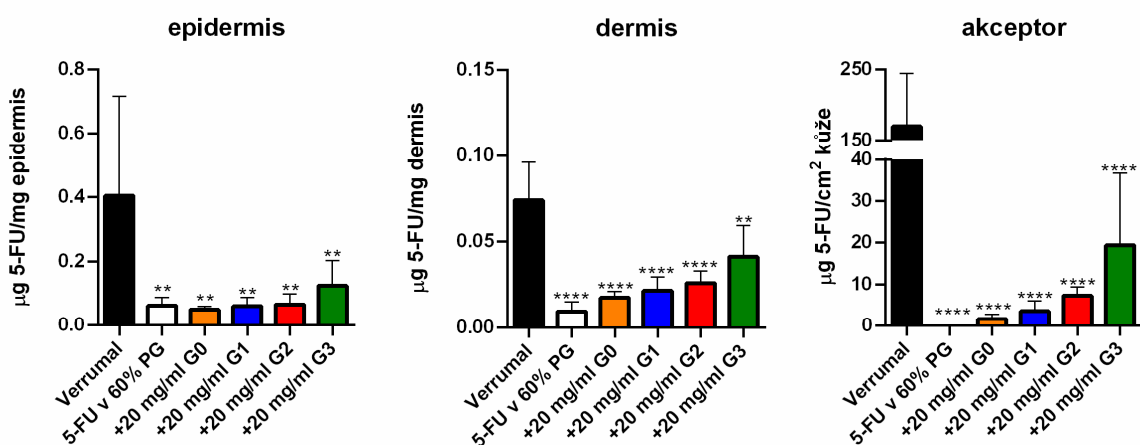
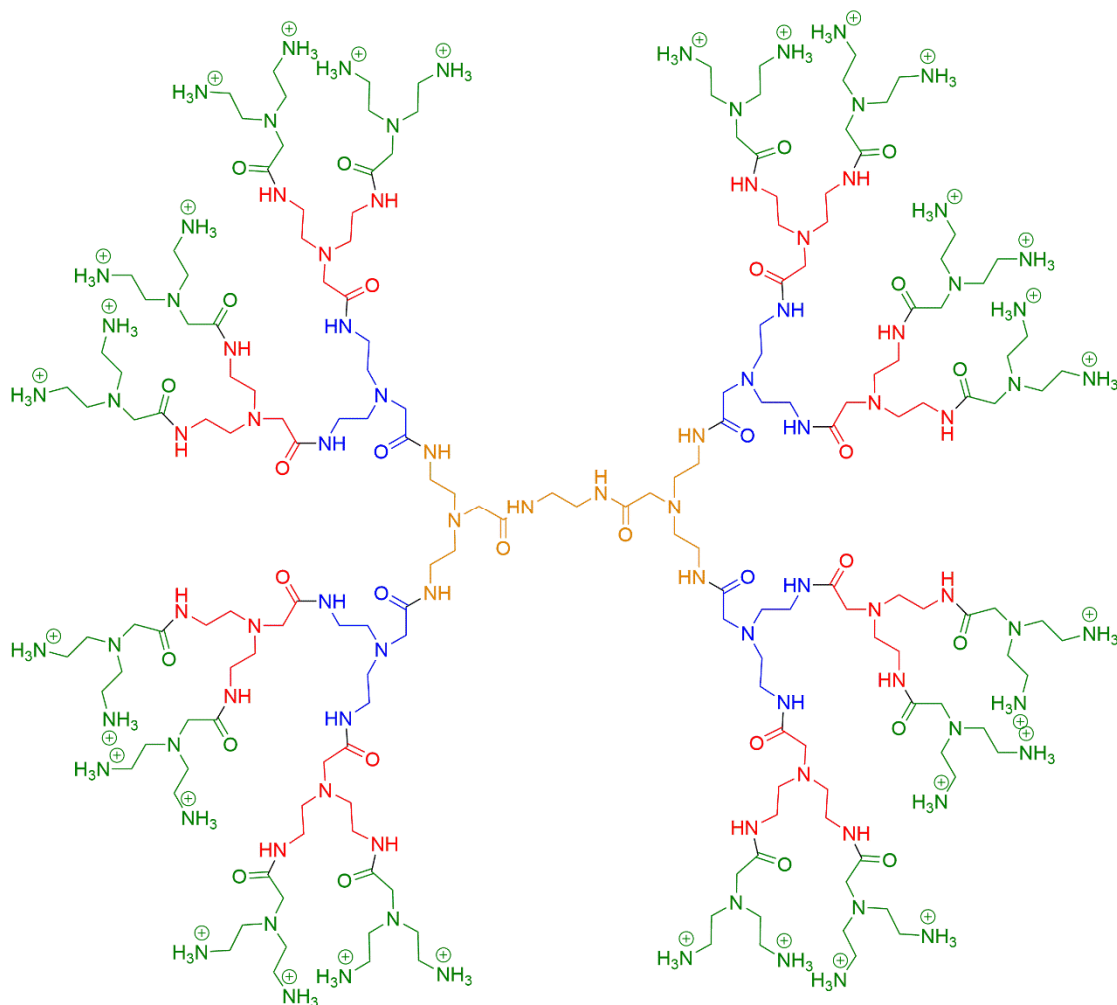
dodávají  $0,017 \pm 0,002$ ,  $0,021 \pm 0,004$ ,  $0,026 \pm 0,003$  a  $0,041 \pm 0,007$   $\mu\text{g}$  účinné látky na mg dermis.



Obrázek č.20 – Graf znázorňující depozici 5-FU v akceptorové fázi

Graf na obrázku č. 20 představuje depozici 5-FU v akceptorové fázi. Verrumal znovu doručil nejvyšší množství 5-FU ( $170,0 \mu\text{g}$  na  $\text{cm}^2$  kůže). Množství léčiva, které prošlo do akceptorové fáze po aplikaci kontrolního roztoku 5-FU v 60% PG v  $\text{H}_2\text{O}$ , nebylo detekovatelné. Formulace obsahující dendrimery, podobně jako v předchozích případech, doručily vyšší množství léčiva do akceptorové fáze, opět v závislosti na zvyšující se generaci. Konkrétně bylo zjištěno, že po aplikaci formulace obsahující G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl a G3-HCl bylo v akceptorové fázi detekováno  $1,614 \pm 0,575$ ,  $3,474 \pm 1,255$ ,  $7,309 \pm 0,840$  a  $19,360 \pm 7,010 \mu\text{g}$  účinné látky na  $\text{cm}^2$  kůže.





Obrázek č. 21 – Shrnutí depozice 5-FU v epidermis, dermis a akceptorové fázi

Aby bylo snazší výsledky z jednotlivých kompartmentů přímo porovnat, je uveden obrázek č. 21, který shrnuje depozici 5-FU v epidermis, dermis a akceptorové fázi a zároveň zobrazuje korespondující strukturu dendrimeru. 5-FU je účinná látka používaná k léčbě kožních

poruch, jako je aktinická keratóza [55] a karcinom bazálních buněk. [56] Obě malignity vznikají z epidermálních melanocytů, které jsou lokalizovány ve spodní části kožní epidermis (bazální vrstva). [57, 58] Účinný systém pro doručení léčiv na tato onemocnění by tedy měl být schopen zlepšit ukládání účinné látky do epidermis, a přitom se vyhnout jejímu dodávání do dermis nebo krevního oběhu.

Podle výsledků získaných v tomto výzkumu, dodává komerčně dostupný farmaceutický roztok do epidermis velmi vysoké množství 5-FU. Na druhou stranu, ukládání účinné látky není selektivní, protože bylo detekováno velmi vysoké množství 5-FU v dermis a v akceptorové fázi. Roztok 5-FU v 60% PG v H<sub>2</sub>O dodal do epidermis nižší množství léčiva než Verrumal (6,5krát nižší), ale měl velmi dobrou selektivitu, protože účinná látka byla detekována pouze ve vrstvách kůže bez jakéhokoli detekovatelného množství v akceptorové fázi. Bylo zjištěno, že formulace obsahující dendrimery dodávají vyšší množství aktivní látky, když je generace vyšší bez jakékoli selektivity. Formulace obsahující G3-HCl ve všech případech dodávala nižší množství léčiva než Verrumal a vyšší množství léčiva než kontrolní roztok. Lze tedy dojít k závěru, že formulace obsahující G3-HCl je méně účinná než Verrumal, ale bezpečnější. Zároveň je účinnější než kontrola, ale méně bezpečná.

Jak bylo dříve uvedeno, koncentrace dendrimery ve formulacích byla 20 mg/ml. Podle dostupných informací neexistuje žádná specifikace optimální koncentrace dendrimery, která by měla být použita k dosažení lepších vlastností. Předchozí výzkumy uvádějí použití dendrimery PAMAM pro ukládání 5-FU do prasečí kůže. [38, 43] Byly použity různé generace (od G2-NH<sub>2</sub> do G6-NH<sub>2</sub>) s aminoskupinou na periférii, zatímco G4-NH<sub>2</sub> byl použit ve třech různých koncentracích (0,1; 1 a 10 mM). PAMAM dendrimery s aminoskupinami na periférii byly schopné zvýšit dodávání léčiva do kůže po 48 hodinách generačně závislým způsobem (G2-NH<sub>2</sub> < G4-NH<sub>2</sub> < G6-NH<sub>2</sub>). Výsledky této práce jsou v souladu s těmito dřívějšími zjištěními. Dále bylo prokázáno, že koncentrace dendrimery ve formulaci je zásadní. Ze tří různých koncentrací použitých pro G4-NH<sub>2</sub> bylo množství léčiva dodaného do kůže vyšší, když byla koncentrace dendrimery nižší. Tento důkaz může naznačovat, že koncentrace dendrimery použitá v této práci nebyla optimální a pro podpoření této hypotézy jsou nutné další experimenty.

## Závěr

V této práci byla navržena a syntetizována nová třída dendrimerů s aminoskupinami na periférii a ethylenediaminovým jádrem, která byla inspirována strukturou PAMAM dendrimerů. Opakující se motiv bis(2-aminoethyl)glycinu byl využit pro růst generací až do třetí generace. Byly připraveny nové dendritické molekuly nulté, první, druhé a třetí generace ve formě chlorovodíkové soli, pro kterou se předpokládá, že má vhodnější vlastnosti pro aplikaci na kůži (především nižší cytotoxicitu než dříve použitá trifluoroctová sůl). Tyto molekuly byly použity jako enhancery kožní permeace ve formulacích obsahující léčivo 5-fluorouracil a testovány pro svou schopnost doručit toto léčivo do kůže.

Výsledky ukázaly, že dendrimery v koncentraci 20 mg/ml v 60% propylenglykolu ve vodě jako vehikulu jsou schopny doručit 5-fluorouracil do různých vrstev kůže a do akceptorové fáze Franzových cel, a to generačně závislým způsobem bez jakékoli selektivity. Do budoucna by bylo vhodné otestovat také různé koncentrace dendrimerů ve formulacích.

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>terc</i> -butyldikarbonyl
Boc	<i>terc</i> -butyloxykarbonyl
DDAIP	dodecylester kyseliny 2-(dimethylamino)propanové
DDAK	Dodecylester kyseliny <i>N,N</i> -dimethyl-6-aminohexanové
DMF	dimethylformamid
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
ESI	ionizace elektrosprejem
5-FU	5-fluorouracil
G0	nultá generace dendrimera
G1	první generace dendrimera
G2	druhá generace dendrimera
G3	třetí generace dendrimera
G4	čtvrtá generace dendrimera
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorofosfat
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPM	isopropylmyristát
IR	infračervená spektroskopie
MeOH	methanol
Mp	teplota tání
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická resonance
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika
PAMAM	polyamidoamino
PBS	izotonický fosfátový pufr
PG	propylenglykol
R <sub>f</sub>	retenční faktor

SC	<i>stratum corneum</i>
T12	transkarbam 12
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie

## Použitá literatura

- [1] LAI-CHEONG, Joey E. a John A. MCGRATH. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* [online]. 2013, **41**(6), 317–320. ISSN 1357-3039, 1878-9390. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017
- [2] MCGRATH, John A. a Jouni UITTO. *Structure and Function of the Skin - McGrath - - Major Reference Works - Wiley Online Library* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118441213.rtd0002>
- [3] CHALABALA, Milan. *Technologie léků*. Praha: Galén, 2001. ISBN 978-80-7262-128-6.
- [4] ČIHÁK, Radomír a Ivan HELEKAL. *Anatomie 3*. 1. vyd. Praha: Grada, 1997. ISBN 978-80-7169-140-2.
- [5] *Structure and Function of Skin | Biology for Majors II* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wmopen-biology2/chapter/structure-and-function-of-skin/>
- [6] *Pharmaceutical Press - Pharmaceutical Press* [online]. [vid. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.pharmpress.com/shop/samples/T&TCh1.pdf>
- [7] VAN SMEDEN, J., M. JANSSENS, G. S. GOORIS a J. A. BOUWSTRA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2014, **1841**(3), 295–313. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbali.2013.11.006
- [8] VÁVROVÁ, Kateřina a Alexandr HRABÁLEK. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství*. 2006, **2**(2), 55–58. ISSN 18012434, 18035329.
- [9] HRABÁLEK, Alexandr a Kateřina VÁVROVÁ. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*. 2006, **1**(1), 8–11. ISSN 18012434, 18035329.
- [10] *Full article: Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects* [online]. [vid. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717540500455975>
- [11] HOLMGAARD, Rikke a Jesper Bo NIELSEN. Dermal absorption of pesticides – evaluation of variability and prevention. nedatováno, 116.
- [12] PATHAN, Dr. Inayat a Chitral SETTY. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research (ISSN: 1596-5996) Vol 8 Num 2* [online]. 2009, **8**. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v8i2.44527
- [13] RABOCH, J. ALGORITMY LÉČBY EXTRAPYRAMIDOVÝCH NEŽÁDOUCÍCH REAKCÍ. nedatováno, 393.

- [14] PRAUSNITZ, Mark R. a Robert LANGER. Transdermal drug delivery. *Nature biotechnology* [online]. 2008, **26**(11), 1261–1268. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1504
- [15] MAYES, Stacey a Marcus FERRONE. Fentanyl HCl patient-controlled iontophoretic transdermal system for the management of acute postoperative pain. *The Annals of Pharmacotherapy* [online]. 2006, **40**(12), 2178–2186. ISSN 1542-6270. Dostupné z: doi:10.1345/aph.1H135
- [16] SIEG, Anke, Richard H. GUY a M. Begoña DELGADO-CHARRO. Noninvasive and minimally invasive methods for transdermal glucose monitoring. *Diabetes Technology & Therapeutics* [online]. 2005, **7**(1), 174–197. ISSN 1520-9156. Dostupné z: doi:10.1089/dia.2005.7.174
- [17] SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *OESTROGEL, 0,6MG/G GEL IX80G, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0076922&tab=texts>
- [18] SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *TESTAVAN, 20MG/G TDR GEL IX85,5G, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0220949&tab=texts>
- [19] KANDIMALLA, Karunya. *Topical drug delivery PowerPoint Presentation, PPT - ID:3096090* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.slideserve.com/jorryn/topical-drug-delivery>
- [20] KOVÁČIK, Andrej, Monika KOPEČNÁ a Kateřina VÁVROVÁ. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations | Request PDF. *ResearchGate* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/338443275\\_Permeation\\_enhancers\\_in\\_transdermal\\_drug\\_delivery\\_benefits\\_and\\_limitations](https://www.researchgate.net/publication/338443275_Permeation_enhancers_in_transdermal_drug_delivery_benefits_and_limitations)
- [21] HRABÁLEK, Alexandr, Pavel DOLEŽAL, Zdenka ŠKLUBALOVÁ, Oldřich FARSA a A Aleš KREBS. AKCELERANTY TRANSDERMALNI PENETRACE. nedatováno, 13.
- [22] CHEN, Yang, Peng QUAN, Xiaochang LIU, Manli WANG a Liang FANG. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, **9**(2), 51–64. ISSN 1818-0876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2014.01.001
- [23] SOWINSKA, Marta a Zofia URBANCZYK-LIPKOWSKA. Advances in the chemistry of dendrimers. *New Journal of Chemistry* [online]. 2014, **38**(6), 2168–2203. ISSN 1369-9261. Dostupné z: doi:10.1039/C3NJ01239E
- [24] FLORY, Paul J. Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. I. Gelation1. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1941, **63**(11), 3091–3096. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01856a061

- [25] FLORY, Paul J. Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. VI. Branched Polymers Containing A—R—Bf-1 Type Units. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1952, **74**(11), 2718–2723. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01131a008
- [26] FRÉCHET, Jean M. J. a Donald A. TOMALIA. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers* | *Wiley Online Books* [online]. [vid. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470845821>
- [27] BUHLEIER, E., Winfried WEHNER a Fritz VOEGTLE. 'CASCADE'- AND 'NONSKID-CHAIN-LIKE' SYNTHESSES OF MOLECULAR CAVITY TOPOLOGIES. In: [online]. 1978. Dostupné z: doi:10.1002/chin.197825228
- [28] NEWKOME, George R., Zhongqi YAO, Gregory R. BAKER a Vinod K. GUPTA. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1985, **50**(11), 2003–2004. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo00211a052
- [29] BOAS, U., J. B. CHRISTENSEN a P. M. H. HEEGAARD. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2006, **16**(38), 3785–3798. ISSN 1364-5501. Dostupné z: doi:10.1039/B611813P
- [30] YANG, Yang, Suhair SUNOQROT, Chelsea STOWELL, Jingli JI, Chan-Woo LEE, Jin Woong KIM, Seema A. KHAN a Seungpyo HONG. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(7), 2154–2162. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm300545b
- [31] GRAYSON, Scott M. a Jean M. J. FRÉCHET. Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2001, **101**(12), 3819–3868. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr990116h
- [32] WALTER, Marie V. a Michael MALKOCH. Simplifying the synthesis of dendrimers: accelerated approaches. *Chemical Society Reviews* [online]. 2012, **41**(13), 4593–4609. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/C2CS35062A
- [33] FRÉCHET, Jean M. J., Y. JIANG, Craig J. HAWKER a A.E. PHILIPPIDES. Proc. IUPAC Int. Symp. Macromol. (Seoul) 1989. nedatováno, 19–20.
- [34] HAWKER, Craig J. a Jean M. J. FRECHET. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1990, **112**(21), 7638–7647. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00177a027
- [35] BOSMAN, A. W., H. M. JANSSEN a E. W. MEIJER. About Dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chemical Reviews* [online]. 1999, **99**(7), 1665–1688. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr970069y
- [36] HALKES, S. Bart A., Ioannis VRASIDAS, Gilbert R. ROOIJER, Albert J. J. VAN DEN BERG, Rob M. J. LISKAMP a Roland J. PIETERS. Synthesis and biological activity of



- polygalloyl-dendrimers as stable tannic acid mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2002, **12**(12), 1567–1570. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/s0960-894x(02)00245-7
- [37] CHENG, Yiyun, Na MAN, Tongwen XU, Rongqiang FU, Xueyuan WANG, Xiaomin WANG a Longping WEN. Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, **96**(3), 595–602. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20745
- [38] VENUGANTI, Venkata Vamsi a Omathanu PERUMAL. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *International journal of pharmaceutics* [online]. 2008, **361**, 230–8. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.034
- [39] NDINGURI, Margaret, Frank FRONCZEK, Patricia MARZILLI, William CROWE, Robert HAMMER a Luigi MARZILLI. Exploring water-soluble Pt(II) complexes of diethylenetriamine derivatives functionalized at the central nitrogen. Synthesis, characterization, and reaction with 5'-GMP. *Inorganica Chimica Acta - INORG CHIM ACTA* [online]. 2010, **363**, 1796–1804. Dostupné z: doi:10.1016/j.ica.2010.02.027
- [40] HAHN, F., Henning SCHRÖDER a Tania PAPE. Halido-Bridged Dinuclear Nickel and Zinc Complexes with a Bis(tripodal) Octaamine Ligand - Unusual Coordination Mode of an ortho Phenylenediamine. *European Journal of Inorganic Chemistry - EUR J INORG CHEM* [online]. 2009, **2009**, 4373–4377. Dostupné z: doi:10.1002/ejic.200900656
- [41] HAHN, F. Ekkehardt, Henning SCHRÖDER, Tania PAPE a Florian HUPKA. Zinc(II), Copper(II), and Nickel(II) Complexes of Bis(tripodal) Diamide Ligands – Reversible Switching of the Amide Coordination Mode upon Deprotonation. *European Journal of Inorganic Chemistry* [online]. 2010, **2010**(6), 909–917. ISSN 1434-1948. Dostupné z: doi:10.1002/ejic.200901145
- [42] KOTINGOVÁ, Lenka a Lenka BORSKÁ. TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE CHEMICKÝCH LÁTEK IN VITRO. *Chem. Listy*. 2009, 7.
- [43] VENUGANTI, Venkata Vamsi K. a Omathanu P. PERUMAL. Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **98**(7), 2345–2356. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21603
- [44] MUTALIK, Srinivas, Pallavi K. SHETTY, Aravind KUMAR, Rohit KALRA a Harendra S. PAREKH. Enhancement in deposition and permeation of 5-fluorouracil through human epidermis assisted by peptide dendrimers. *Drug Delivery* [online]. 2014, **21**(1), 44–54. ISSN 1521-0464. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2013.845861
- [45] LANGEROVÁ, Martina. *Nové polyamidoaminodendrimery s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii: Syntéza a potenciální využití při (trans)dermálním přenosu léčiv* [online]. B.m., nedatováno [vid. 2020-05-09]. b.n. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/209465/>

- [46] J. DYSON, Paul a Philip G. JESSOP. Solvent effects in catalysis: rational improvements of catalysts via manipulation of solvent interactions. *Catalysis Science & Technology* [online]. 2016, **6**(10), 3302–3316. Dostupné z: doi:10.1039/C5CY02197A
- [47] CORNISH, J., K. E. CALLON, C. Q. LIN, C. L. XIAO, T. B. MULVEY, G. J. COOPER a I. R. REID. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *The American Journal of Physiology* [online]. 1999, **277**(5), E779-783. ISSN 0002-9513. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.1999.277.5.E779
- [48] WADA, Kiyoko, Toshihisa MIZUNO, Jun-Ichi OKU a Toshiki TANAKA. pH-induced conformational change in an alpha-helical coiled-coil is controlled by His residues in the hydrophobic core. *Protein and Peptide Letters* [online]. 2003, **10**(1), 27–33. ISSN 0929-8665. Dostupné z: doi:10.2174/0929866033408354
- [49] PACE, C. Nick, Saul TREVIÑO, Erode PRABHAKARAN a J. Martin SCHOLTZ. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* [online]. 2004, **359**(1448), 1225–1234; discussion 1234-1235. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2004.1500
- [50] SHEN, C. L., M. C. FITZGERALD a R. M. MURPHY. Effect of acid predissolution on fibril size and fibril flexibility of synthetic beta-amyloid peptide. *Biophysical Journal* [online]. 1994, **67**(3), 1238–1246. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(94)80593-4
- [51] PINI, Alessandro, Luisa LOZZI, Andrea BERNINI, Jlenia BRUNETTI, Chiara FALCIANI, Silvia SCALI, Stefano BINDI, Tiziana DI MAGGIO, Gian Maria ROSSOLINI, Neri NICCOLAI a Luisa BRACCI. Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions. *Amino Acids* [online]. 2012, **43**(1), 467–473. ISSN 1438-2199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-011-1103-z
- [52] NICOLAZZO, Joseph A., Timothy M. MORGAN, Barry L. REED a Barrie C. FINNIN. Synergistic enhancement of testosterone transdermal delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 2005, **103**(3), 577–585. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2004.12.007
- [53] HOELGAARD, Annie a Birgitte MØLLGAARD. Dermal drug delivery — Improvement by choice of vehicle or drug derivative. *Journal of Controlled Release* [online]. 1985, **2**, 111–120. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/0168-3659(85)90037-9
- [54] LANE, Majella E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **447**(1), 12–21. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.040
- [55] GOLD, Michael H. a Mark S. NESTOR. Current treatments of actinic keratosis. *Journal of drugs in dermatology: JDD*. 2006, **5**(2 Suppl), 17–25. ISSN 1545-9616.
- [56] GROSS, Kenneth, Leon KIRCIK a Greg KRICORIAN. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial Basal cell carcinoma: efficacy, tolerability, cosmetic

- outcome, and patient satisfaction. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* [online]. 2007, **33**(4), 433–439; discussion 440. ISSN 1076-0512. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-4725.2007.33090.x
- [57] KIM, Dennis P., Kylee J. B. KUS a Emily RUIZ. Basal Cell Carcinoma Review. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [online]. 2019, **33**(1), Cutaneous Malignancy, 13–24. ISSN 0889-8588. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2018.09.004
- [58] DE OLIVEIRA, Erika C. V., Valéria R. V. DA MOTTA, Paola C. PANTOJA, Carolina S. de O. ILHA, Renata F. MAGALHÃES, Hassan GALADARI a Gislaine R. LEONARDI. Actinic keratosis - review for clinical practice. *International Journal of Dermatology* [online]. 2019, **58**(4), 400–407. ISSN 1365-4632. Dostupné z: doi:10.1111/ijd.14147